

Aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. M. Hertl
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Immunologische Pathomechanismen
bei Spätypallergie
auf Betalactamantibiotika**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Carolin Schäfer aus Bonn

Marburg, 2016

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 21.03. 2016

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Pfützner

Korreferent: Prof. Dr. S. Bauer

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis:	IX
Zusammenfassung	X
Summary	XII
1 Einleitung	1
1.1 Allergische Erkrankungen	1
1.2 Allergietypen	1
1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp oder anaphylaktischer Reaktionstyp).....	2
1.2.2 Typ-II-Reaktion (Antigen-Antikörper-Interaktionstyp, zytotoxischer Reaktionstyp)	2
1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplextyp).....	3
1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Spättyp).....	3
1.3 Arzneimittelallergie	5
1.4 Epidemiologie allergischer Erkrankungen	7
1.5 Pathophysiologie der Spättypallergie	11
1.6 Betalactamantibiotika	12
1.7 Diagnostik der Spättypreaktion	13
1.7.1 Orale Provokationstestung (OPT).....	14
1.7.2 Immunhistochemie.....	15
1.8 T-Lymphozyten im Zusammenhang einer Spättypallergie	16
1.8.1 T-Helferzellen	16
1.8.2 Regulatorische T-Zellen.....	20
2 Ziele der Arbeit im Kontext der Typ IV-Reaktion	27
3 Material	28
3.1 Patientenmaterial	28
3.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen.....	28
3.3 Zytokine und Proteinantigene.....	28
3.4 Betalactamantibiotika	28
3.5 Chemikalien.....	29
3.6 Puffer und Kulturmedien.....	29
3.7 Antikörper für durchflusszytomertische Analysen.....	30

	<u>Seite</u>
3.8 Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik.....	30
3.9 Verbrauchsmaterialien.....	31
3.10Geräte	31
3.11Software.....	32
4 Methoden	33
4.1 Patienten	33
4.2 Klinische Evaluationen.....	33
4.2.1 Pricktest.....	34
4.2.2 Intrakutantest.....	35
4.2.3 Epikutantest.....	36
4.2.4 Orale Provokationstestung	37
4.3 Zelluläre Diagnostik	38
4.3.1 Messung des spezifischen und Gesamt-IgE auf Betalactamantibiotikum	38
4.3.2 Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation.....	38
4.3.3 Kryokonservierung und Auftauen der PBMC	40
4.3.4 Durchflusszytometrie	40
4.3.5 Frequenzanalyse von CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} regulatorischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	41
4.3.6 Frequenzanalyse antigenspezifischer T-Zellen durch das <i>enzyme-linked immunospot</i> (ELISPOT)-Verfahren	42
4.3.7 Frequenzanalyse von Betalactam-spezifischen T-Zellen durch das ELISPOT- Verfahren bei Allergikern und gesunden Kontrollen.....	42
5 Ergebnisse	45
5.1 Resultate der allergologischen Testungen mit Betalactamantibiotika.....	45
5.2 Unterschiede humoraler Faktoren nach Betalactamexposition/- testung	50
5.2.1 Bestimmung der Gesamt- und spezifischen Immunglobulin-E-Konzentration in allen vier Probandengruppen	50
5.3 Veränderungen zellulärer Faktoren nach Betalactamexposition/-testung.....	50
5.3.1 Frequenzen Betalactam-spezifischer T-Zellpopulationen nach Stimulation mit dem jeweiligen Betalactamantibiotikum.....	50
5.3.2 Frequenzen von Amoxicillin-spezifischen T-Zellpopulationen bei Nicht- allergischen Patienten unter Antibiotikatherapie	54
5.3.3 Proportionale Veränderungen der Betalaktam-spezifischen T- Zellsubpopulationen.....	56
5.3.4 Der Einfluss von Betalactamantibiotika auf die Anzahl CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut	58

	<u>Seite</u>
6 Diskussion.....	60
6.1 Humorale Veränderungen	61
6.2 T-Zelluläre Veränderungen nach Betalactamstimulation.....	62
6.2.1 Der Einfluss von Betalactamantibiotikum auf T-Helfer-Zellen	62
6.2.2 Regulatorische T-Zellen.....	65
6.3 Fazit	69
7 Literaturverzeichnis	71
8 Danksagung.....	84
9 Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10 Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation	86
11 Schriftenverzeichnis	87
12 Verzeichnis akademischer Lehrer	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AEC	Aminoethylcarbazol
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	engl.: <i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	engl.: <i>cyclic adenosine monophosphate</i> (zyklisches Adenosinmonophosphat)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISPOT-Assay	engl.: <i>enzyme-linked immunospot assay</i> (enzymgekoppelter Immunspotttest)
et al.	lat.: et alii (und andere)
FACS	engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i> (fluoreszenzaktivierte Zelltrennung; Durchflusszytometrie)
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FcεR	Fc epsilon Rezeptor
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FITC	Flourescein-Isothiocyanat
Foxp3	engl.: <i>forkhead winged-helix transcriptional factor Box p3</i> (Transkriptionsfaktor Forkhead-Box-Protein P3)
FSC	engl.: <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
g	a) Gramm b) Beschleunigung der Erdanziehungskraft (9,81 m/s ²)
GATA-3	GATA-bindendes Protein 3
HLA	engl.: <i>human leukocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HRP	engl.: <i>horseradish peroxidase</i> (Merrettich- Peroxidase)

IFN- γ	Interferon gamma
Ig.....	Immunglobulin
IL	Interleukin
Iso-K.....	Isotypkontrolle
iTreg-Zelle.....	induzierbare regulatorische T-Zelle
k.....	kilo
Kap.	Kapitel
l.....	Liter
m.....	a) milli ($\times 10^{-3}$) b) Meter c) Monat
M	Molar
MACS.....	engl.: <i>magnetic cell separation</i> (magnetische Zellseparation)
MHC.....	engl. <i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
Min	Minute(n)
n.....	a) engl.: <i>number</i> (Anzahl) b) Nano ($\times 10^{-9}$)
NK-Zelle.....	natürliche Killerzelle
nTreg-Zelle.....	natürliche regulatorische T-Zelle
OPT	orale Provokationstestung
PBMC.....	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS.....	engl.: <i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
PFA.....	Paraformaldehyd
PHA.....	Phytohämagglutinin
PHS.....	engl.: <i>pooled human serum</i> (gepooltes Humanserum)
rpm	Rotation pro Minute
s.o.	siehe oben
sog.	so genannt
SSC.....	engl.: <i>side scatter</i> (seitliches Streulicht)
STAT.....	engl.: <i>signal transducer and activator of transcription</i> (Signalüberträger und Transkriptionsaktivator)
s.u.	siehe unten
Tab.....	Tabelle
T-bet	engl.: <i>T-box</i>

TCR	engl.: <i>T cell receptor</i> (T-Zellrezeptor)
Teff-Zelle	Effektor-T-Zelle
TGF	engl.: <i>transforming growth factor</i> (transformierender Wachstumsfaktor)
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg-Zelle.....	regulatorische T-Zelle
Tr1-Zelle.....	Typ-1-regulatorische T-Zelle
U	engl.: <i>units</i> (Einheiten)
u.a.	unter anderem
vgl.....	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
°C.....	Grad Celsius
μ.....	mikro (x 10 ⁻⁶)

In der Arbeit verwendete englische Bezeichnungen (z.B. Eigennamen) sind *kursiv* dargestellt.

Abbildungsverzeichnis

	<u>Seite</u>
Abb. 1:	Schematische Darstellung der Allergietypen nach Coombs und Gell. 4
Abb. 2:	Gemeinsames Merkmal der Betalactame ist der antibakteriell wirkende β -Lactamring 12
Abb. 3:	Aktivierung und Polarisierung von (n)-Th-Zellen nach Antigenkontakt..... 20
Abb. 4:	Differenzierung von regulatorischen T-Zellen im Thymus und in der Peripherie. 25
Abb. 5:	Schematische Darstellung eines Prick-Tests..... 35
Abb. 6:	Durchführung eines Epikutantest mittels „ <i>Finn Chamber</i> .“ 37
Abb. 7:	Schematische Darstellung einer Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (modifiziert nach BIOCOMPARE) 39
Abb. 8:	Schematische Darstellung eines ELISPOT Assays (modifiziert nach MABTECH)..... 44
Abb. 9:	Durchführung der Studie mittels Flussdiagramm 45
Abb. 10:	Rückbildung eines klassisch makulopapulöses Exanthems am Rumpf nach Einnahme eines Penicillinpräparats 47
Abb. 11:	Deutliche Spättypreaktion im Epikutantest 47
Abb. 12:	Eindeutige Reaktion auf Amoxicillin (Quaddel-Nr.4) im Intrakutantest 48
Abb. 13:	Nach oraler Provokationstestung zeigt sich an unterschiedlichen Stellen des Integument (hier dorsal des rechten Oberarms) ein Exanthem nach Provokation mit dem Betalactamantibiotikum Clindamycin..... 48
Abb. 14:	Frequenzbestimmung der zytokinsezernierenden T-Zellen mittels ELISPOT Verfahren 51
Abb. 15:	Beispielgrafik mit den unterschiedlichen Konzentrationsansätzen für das Antibiotikum Amoxicillin..... 52
Abb. 16:	Die Frequenzen Interleukin (IL)-5-produzierender Th2-Zellen in den vier Probandengruppen 53
Abb. 17:	Die Frequenzen IFN- γ -produzierender Th1-Zellen in den vier Probandengruppen 53
Abb. 18:	Die Frequenzen Interleukin (IL)-10-produzierender T-Zellen in den vier Probandengruppen 54
Abb. 19:	Veränderung IFN- γ -sezernierender Th1-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe 55
Abb. 20:	Veränderung IL-5-sezernierender Amoxicillin-spezifischer Th2-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe 55
Abb. 21:	Veränderung IL-10-sezernierender Tr1-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe 56
Abb. 22:	Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-2-Zellen (Th2) zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen 57

	<u>Seite</u>
Abb. 23: Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-1-Zellen (Th1) zu T-Helfer-2-Zellen (Th2)	57
Abb. 24: Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-1-Zellen (Th1) zu Typ-1-regulatorischen T-Zellen (Tr1)	58
Abb. 25: Der Frequenzverlauf von CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} Treg-Zellen in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen	59
Abb. 26: Der Frequenzverlauf von CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} Treg-Zellen in der Gruppe 3 unter dreitägiger systemischer Amoxicillingabe	59

Tabellenverzeichnis

	<u>Seite</u>
Tab. 1: Unerwünschte Medikamentenreaktionen.....	6
Tab. 2: Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme	33
Tab. 3: Patientencharakteristik der jeweiligen Probandengruppen	46
Tab. 4: Reaktionen der Allergiker aus Gruppe 1 und 2 im Überblick	48

Zusammenfassung

Die Entwicklung von Allergien ist auf das komplexe Zusammenspiel zwischen genetischen Faktoren und bestimmten Umwelteinflüssen zurückzuführen. Bei etwa 25% der Menschen entwickeln sich überschießende Immunantworten, die durch harmlose Umweltstoffe wie Pollen oder Nahrungsmittel aber auch Arzneimittel ausgelöst werden können.

Die Arzneimittelallergie hat in den letzten Jahren stetig an Bedeutung zugenommen. Hierbei kommt es zu einer immunologisch vermittelten Überempfindlichkeit auf ein Medikament, die sich nach den zugrunde liegenden Pathomechanismen als allergische Soforttypreaktion oder als Spättypreaktion nach Coombs und Gell äußern kann. Die Betalactamantibiotika gehören zu den häufigsten Auslösern allergischer Medikamentenreaktionen. Der Pathomechanismus einer Soforttypreaktion auf Penicilline entspricht einer klassischen IgE-vermittelten Reaktion. Demgegenüber steht die Spättypreaktion, bei der es zur Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten und zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommt, durch die schließlich die entsprechende Hautreaktion in Form eines Exanthems hervorgerufen wird.

Die vorliegende Studie wurde mit vier unterschiedlichen Probandengruppen durchgeführt, bei denen Untersuchungen mit verschiedenen Betalactamantibiotika (Penicillin G, Amoxicillin, Ampicillin und Cefuroxim) durchgeführt wurden. Im Fokus der Studie standen dabei Allergiker vom Spättyp. Diese wurden klinisch und immunologisch mit Kollektiven von Soforttypallergikern sowie von nicht-allergischen Individuen mit und ohne Betalactamexposition als Kontrollgruppen verglichen. Zu diesem Zweck wurden allergologische In-vivo-Testverfahren wie Hauttests (Prick-, Intrakutan-, Epikutantest) und die orale Provokationstestung durchgeführt. Auf Basis der hierbei gewonnenen Ergebnisse erfolgte neben der Anamnese die klinische Charakterisierung und Einteilung in die vorab festgelegten Probandengruppen. Durch die anschließenden Verfahren der In-vitro-Diagnostik wurden sowohl allergenspezifische Antikörper im Serum als auch die Frequenzen allergenspezifischer T-Zellpopulationen im peripheren Blut anhand Zell-spezifischer Markerzytokine (IFN- γ , IL-5 und IL-10) bestimmt. Zusätzlich wurde die Frequenz regulatorischer T(reg)-Zellen anhand des Oberflächenmarkerprofils CD4⁺CD25⁺CD127^{low} untersucht. Die hierbei ermittelten immunologischen Parameter der Spättypallergiker wurden mit denen der anderen Studienkollektive verglichen.

Die Studienergebnisse zeigten eine unauffällige humorale Antwort im Vergleich der vier verschiedenen Probandengruppen. Auf zellulärer Ebene konnte das Kollektiv der Spättypallergi-

ker nicht über die häufig postulierte vermehrte IFN- γ -Sekretion von den anderen drei Patientengruppen abgegrenzt werden, jedoch fand sich eine gesteigerte Th2-Zellantwort bei den Soforttypallergikern. Es ließen sich keine Unterschiede der Anzahl IL-10-sezernierender Tr1-Zellen nach In-vitro-Betalactamstimulation in allen vier Gruppen detektieren, allerdings zeigte sich in der mit Betalactamantibiotika behandelten Kontrollgruppe ein tendenzieller Anstieg von IFN- γ^+ und IL-10 $^+$ T-Zellen. Dies könnte ein Hinweis für die Induktion eines protektiven Mechanismus bei gesunden Probanden nach Antibiotikastimulation sein. Andererseits fand sich eine tendenzielle Abnahme der CD4 $^+$ CD25 $^+$ CD127 low Treg-Population in dieser Kontrollgruppe während der dreitägigen systemischen Betalactamtherapie, was die Komplexität möglicher immunologischer Reaktionsmechanismen auf Betalaktamantibiotika unterstreicht. Insofern liefern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit einige interessante Ansatzpunkte für weitere wissenschaftliche Untersuchungen zu dem insgesamt noch sehr wenig erforschten Gebiet der Arzneimittelallergie.

Summary

The development of allergies is a complex interaction between genetic factors and environmental influences. About 25% of the population acquires an immune-mediated hypersensitivity reaction to harmless environmental antigens like pollen, food or drugs during lifetime.

In the last years the impact of drug allergies has increased gradually. The immune-mediated hypersensitivity response to drugs can be classified into an immediate and a non-immediate type according to Coombs and Gell. The pathomechanism of the immediate hypersensitivity reaction is mediated by specific IgE antibodies. In case of delayed-type hypersensitivity reactions, drug-specific T cells are activated and secretion of proinflammatory cytokines leads to the respective skin responses like occurrence of exanthema. Among drug-allergies beta-lactam antibiotics are one of the most common triggers.

In the present study different antibiotics (penicillin G, amoxicillin, ampicillin and cefuroxime) were tested on four distinct subject cohorts. Since this study mainly focused on the delayed-type of drug reactions, patients with non-immediate type reactions were compared to a cohort of patients with immediate-type hypersensitivity and to two cohorts of non-allergic individuals, one of them was exposed to beta-lactams. For this purpose different in-vivo-skin tests like intracutaneous, skin prick and epicutaneous tests as well as oral provocation tests were performed. On the basis of these test results and the anamneses, subjects were clinically characterized and categorized into the four different cohorts. Subsequently, in-vitro-diagnostic methods were performed to analyze the allergen-specific serum antibodies and the frequencies of allergen-specific T cell populations depending on their effector cytokines (IFN- γ , IL-5 and IL-10) in the peripheral blood of the patients. In addition, regulatory T (Treg) cells were quantified according to the surface marker profile CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. Finally, all of the immunological parameters obtained for the patients with delayed-type drug reactions were compared to the other three cohorts.

The results of the study showed no substantial differences in the humoral response between all four tested cohorts. Although an increase of drug-specific IFN- γ ⁺ T cells could not be detected in delayed-type, there was an increase of IL-5⁺ Th2 cells in the cohort of patients with immediate-type drug allergy. Additionally, there were no differences in IL-10-secreting type-1-Treg (Tr1) cells detectable after beta-lactam stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) comparing the four cohorts. However, the cohort of healthy individuals showed an increase of drug-specific IFN- γ ⁺ and IL-10⁺ T cells by trend. This could indicate a protec-

tive immune mechanism in healthy individuals after exposure to beta-lactam antibiotics. On the other hand, a decrease of the $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{low}$ Treg population could be observed in the non-allergic control cohort during the three days of systemic beta-lactam treatment. These findings highlight the complexity of immunological mechanisms after drug exposure. Thus, the results of this study might provide both novel insights and new starting points for future research in the field of drug allergy.

1 Einleitung

1.1 Allergische Erkrankungen

Das Immunsystem ist lebensnotwendig für den Körper – es schützt den Menschen vor Infektionen und ist für den Erhalt der Gesundheit essenziell. Allerdings ist der Körper nicht vollkommen und eine Abwehrfunktion ist nur dann effektiv, wenn der Körper zwischen körpereigenen und körperfremd unterscheiden kann (Jäger 2000). Bei etwa 25% der Menschen entwickeln sich überschießende Immunantworten, die durch harmlose Umweltstoffe wie Pollen, Nahrungsmittel, Hausstaub oder Tierhaare aber auch Arzneimittel ausgelöst werden können (Garn and Renz 2007). Diese Überempfindlichkeit des Körpers wird als „Allergie“ bezeichnet, altgriechisch für die Fremdreaktion aus *allos* (fremd) und *to ergon* (die Reaktion). Allergien zählen heute zu einer der häufigsten Formen der Immunreaktionen, die zur Überempfindlichkeitsreaktionen beim Menschen gezählt werden (Janeway and M. Walport 2009).

Der Terminus Allergie wurde 1906 zum ersten Mal von dem Freiherr Clemens von Pirquet, einem Wiener Kinderarzt, geprägt. Pirquet, dessen Forschungsschwerpunkt auf dem Gebiet der Infektiologie und Immunologie zu finden war, vertrat die Ansicht, dass es sich bei einer Allergie um eine allgemeine Veränderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus handelt, welche sich sowohl in Form einer Über- als auch Unterempfindlichkeitsreaktion äußern kann (Huber 2006). Er ging davon aus, dass die Änderung der Reaktionsfähigkeit nicht nur von äußeren Substanzen, sog. Allergenen, sondern auch von inneren, organismuseigenen Faktoren abhängig war. Zudem beobachtete er, dass Antikörper nicht nur schützende Immunantworten vermitteln, sondern beim Menschen auch zu Überempfindlichkeitsreaktionen führen können (Huber 2006). Allergische Symptome stellen sich unterschiedlich dar und treten an verschiedenen Effektororganen des Körpers auf. Sie zeigen sich bspw. in Form einer allergischen Rhinitis und Konjunktivitis der Schleimhäute, einem Asthma bronchiale der Atemwege, durch eine atopische Dermatitis oder auch als Urtikaria der Haut. Darüber hinaus können schwere allergische Reaktionen gastrointestinal zu Erbrechen und Durchfällen führen, bis hin zu akuten Herz- Kreislaufversagen aufgrund eines anaphylaktischen Schocks.

1.2 Allergietypen

Allergische Immunreaktionen unter Berücksichtigung verschiedener immunologischer Krankheiten und pathophysiologischer Mechanismen wurden 1963 zum ersten Mal von

Coombs und Gell in vier verschiedene Typen eingeteilt (Pamphilon and Scott 2007). Die ersten drei Reaktionen beruhen überwiegend auf humoralen Faktoren, wohingegen die vierte, die Spättypreaktion, primär durch eine zellulär vermittelte Immunantwort gekennzeichnet ist (Enzmann 1980).

1.2.1 Typ-I-Reaktion (Soforttyp oder anaphylaktischer Reaktionstyp)

Der Soforttyp ist eine Überempfindlichkeitsreaktion, die immunologisch durch IgE- Antikörper vermittelt wird (Janeway and M.Walport 2009). Durch eine fehlgeleitete Immunantwort auf harmlose Umweltantigene (vgl. 1.1) oder Arzneimittel kommt es zur gegen diese gerichtete Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern (Sensibilisierungsphase) (Garn and Renz 2007). Bei erneutem Kontakt und Bindung des Antigens an IgE-Antikörper entsteht eine Quervernetzung der Antikörper auf einer Mastzelle oder einem basophilen Granulozyten. Es kommt zur Degranulation mit einer Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren. Da die Symptome innerhalb weniger Minuten eintreten, wird von einer Soforttypreaktion gesprochen.

Klinisch manifestiert sich der Soforttyp insbesondere durch eine allergische Rhinitis, Konjunktivitis, Asthma bronchiale, Urtikaria, Angioödem oder einer systemischen Anaphylaxie mit potentiell Herz-Kreislaufversagen (Kirchner 2002; Riedl and Casillas 2003).

1.2.2 Typ-II-Reaktion (Antigen-Antikörper-Interaktionstyp, zytotoxischer Reaktionstyp)

Bei der Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ II binden sich körperfremde Antigene direkt an eine Körperzelle, wodurch die Zelle zu einem Antigen wird. Es kommt zur Bindung von IgG- und IgM-Antikörpern an die Antigene auf der Körperzelle und Aktivierung des Komplementsystems. Diese führt zur Stimulierung von Phagozyten und natürlichen Killerzellen (NK), die an den Fc-Teil der Antikörper binden, körperfremdes Eiweiß zersetzen und Zellwände auflösen (Rajan 2003). Infolge einer Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ II entstehen unterschiedliche Erkrankungen, wie z. B. Goodpasture Syndrom, bullöses Pemphigoid, thrombozytopenische Purpura und autoimmunhämolytischen Anämien (Kirchner 2002; Riedl and Casillas 2003). Medikamente, z.B. Penicilline und Cephalosporine, können zu einer hämolytischen Anämie oder zu einer Thrombozytopenie führen, da das Arzneimittel an die Zelloberfläche bindet und durch die Antikörper attackiert wird. Der dadurch bedingten Zellzerstörung folgt die Entfernung der Zelle aus dem Blut durch Gewebemakrophagen (Janeway and M.Walport 2009).

1.2.3 Typ-III-Reaktion (Immunkomplextyp)

Bei der Reaktion des Immunkomplextyps werden Antikörper gegen lösliche Antigene im Blut gebildet. Dadurch entstehen zwischen Antigenen und Antikörpern Vernetzungen, die zu Komplexbildung z.B. an der Membran von Kapillaren in der Haut, Lunge und Niere führen. Die Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren das Komplementsystem und verschiedene Leukozyten. Hierdurch entsteht eine Entzündungsreaktion mit Gewebsverletzung an den betroffenen Organen (Rajan 2003).

Das daraus resultierende klinische Bild präsentiert sich in Form einer Vaskulitis, Glomerulonephritis oder allergischen Alveolitis (Kirchner 2002; Riedl and Casillas 2003).

1.2.4 Typ-IV-Reaktion (Spättyp)

Bei der Reaktion des verzögerten Typs kommt es zur Aktivierung von allergenspezifischen T-Zellen. Nach erstem Antigenkontakt gegen niedermolekulare Antigene, die nicht frei im Blut zirkulieren, sondern sich als Peptide oder Haptene auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) befinden, werden im Rahmen einer Sensibilisierungsphase im Lymphknoten antigenspezifische T-Zellen aktiviert. Gleichzeitig entstehen Gedächtnis-T-Zellen, die durch erneuten Antigenkontakt (Auslösephase) nach 24-72 Stunden zu einer Ausschüttung immunologischer Botenstoffe und zur Einwanderung von Makrophagen und Monozyten führen. Eine Entzündungsreaktion mit Gewebsschädigung ist die Folge.

Typische klinische Erscheinungsbilder der Spättypreaktion sind das Arzneimittelexanthem, die Kontaktdermatitis, oder auch die verzögerte Reaktion auf Tuberkulin und Transplantatabstoßungen (Meves 2006; Janeway and M.Walport 2009).

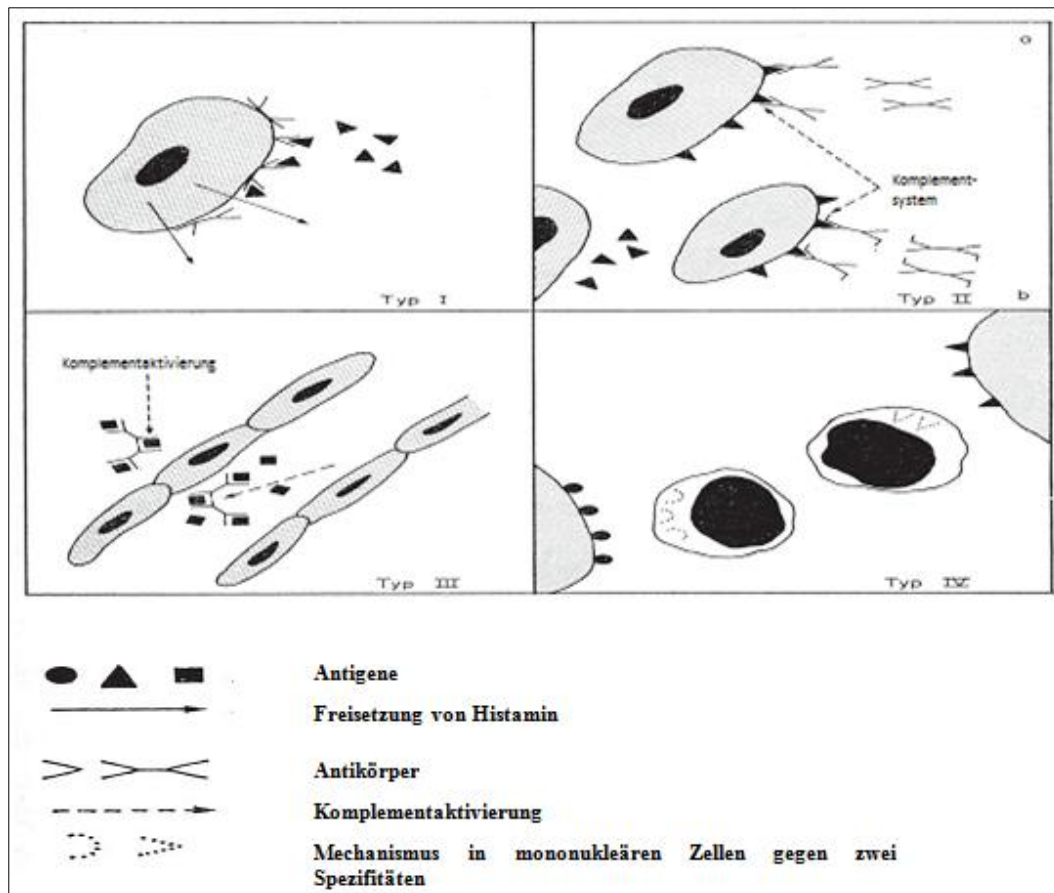


Abb. 1: Schematische Darstellung der Allergietypen nach Coombs und Gell.

Typ I: Antigen-Antikörper-Bindung auf einer Mastzelle mit anschließender Freisetzung von Histamin und Entzündungsmediatoren.

Typ II: Bindung von körperfremden Antigenen direkt an die Körperzelle, Detektion und Bindung von oberflächlichen Antigenen durch IgM, IgG-Antikörper sowie Aktivierung des Komplementsystems und Bekämpfung der Antigene durch Apoptose.

Typ III: Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen und Aktivierung von Leukozyten und des Komplementsystems. Entstehung einer Entzündungsreaktion mit Gewebsverletzungen an den jeweiligen Organen.

Typ IV: Ausschüttung von Botenstoffen und Einwanderung von Monozyten und Makrophagen durch Gedächtnis-T-Zellen, die mit den Antigenen reagieren, welche sich auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen befinden.

1.3 Arzneimittelallergie

Eine unerwünschte Arzneimittelwirkung definiert die Weltgesundheitsorganisation (WHO 1966) als eine unbeabsichtigte, gesundheitsschädliche und nicht erwünschte Reaktion auf ein Arzneimittel.

Arzneimittelnebenwirkungen werden als ein bedeutendes gesellschaftliches Gesundheitsproblem angesehen, das eine lebensbedrohliche Verlaufsform annehmen kann.

Dabei ist zwischen verschiedenen unerwünschten Medikamentenreaktionen zu differenzieren. Die Wissenschaftler Rawlins und Thompson klassifizierten erstmalig die unerwünschten Arzneimittelreaktionen in zwei Hauptgruppen: Typ A und Typ B (Davies, Ashton et al. 1977).

Die große Mehrzahl der Arzneimittelreaktionen (>80%) sind Typ A-Reaktionen. Sie sind vorhersehbare Arzneimittelreaktionen, pharmakologisch erklärbar und können bei jedem Individuum vorkommen (Wantke and Wöhl 2008). Der Typ A beinhaltet häufig milde, ungünstige Effekte wie Übelkeit und Erbrechen (Thong, Leong et al. 2003). Die unerwünschten Arzneimittelwirkungen des Typ A sind im Arzneimittelcodex vermerkt und in der Regel schon vor der Registrierung eines Arzneimittels aus den Zulassungsstudien bekannt (Wantke and Wöhl 2008). Der Typ B umfasst die unvorhersehbaren Arzneimittelreaktionen. Sie treten seltener auf als die Typ A-Reaktionen (15-20%) und sind pharmakologisch nicht erklärbar. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Typ A-Reaktionen treten die Typ B-Reaktionen nur bei empfänglichen Individuen auf. Der Typ B ist spezifisch, häufig immunologisch bedingt und zeigt sich in Form von unterschiedlichen Überempfindlichkeitsreaktionen, die sich im schlimmsten Fall lebensbedrohlich darstellen können (Thong, Leong et al. 2003; Smith and Aston-Jones 2008).

Nach der ursprünglichen Einteilung in die zwei benannten Hauptgruppen wurde das Klassifikationschema der unerwünschten Medikamentenreaktionen um vier weitere, aber selten verwendete, Klassen erweitert (vgl. Tab. 1) (Wantke and Wöhl 2008).

Tab. 1: Unerwünschte Medikamentenreaktionen

Reaktionstyp	Charakteristika	Beispiele
A	Dosisabhängig Häufig Vorhersehbar Durch pharmakologische Wirkung erklärbar Niedrige Mortalität	Digitalistoxizität Sedierung durch Antihistaminika der 1. Generation Anioödem durch ACE-Hemmer
B	Dosisunabhängig Selten Unvorhersehbar Nicht durch pharmakologische Wirkung erklärbar Mortalität möglich	Immunologische Reaktion Typ I-IV z.B. Arzneimttelexanthem Hypersensitivitätsreaktionen
C	Dosis- und zeitabhängig	Nebennierenrindensuppression durch Glucokortikosteroide
D	Selten Zeitabhängig	Teratogenese Karzinogenese
E	Sehr selten Entzug	Myokardischämie nach Absetzen von β -Blockern
F	Häufig Dosisabhängig	Gesteigerter Metabolismus von oralen Kontrazeptiva bei gleichzeitiger Einnahme von Enzyminduktoren (z.B. Cephalosporine)

Tabelle 1: Neben den benannten Hauptgruppen A und B der unerwünschten Arzneimittelreaktionen wurde das ursprüngliche Klassifikationsschema von Rawlins und Thomson um vier weitere Klassen erweitert (modifiziert nach (Wantke and Wöhl 2008)).

Zu den Typ-B-Reaktionen gehören die Arzneimittelallergien. Nach einem Bericht des *Nomenclature Review Committee* von Oktober 2003 ist die Arzneimittelallergie eine Hypersensitivitätsreaktion, die zumeist als eine IgE- oder T-Zell-vermittelte Reaktion auftritt (Soforttyp- oder Spättypreaktion) (Johansson, Bieber et al. 2004).

Allergische Reaktionen vom Soforttyp werden durch allergenspezifische IgE-Antikörper vermittelt (vgl. 1.2.1) und können bspw. durch bestimmte Antibiotika, wie Penicilline, unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder hervorrufen, die von der Urtikaria oder dem Quincke-Ödem bis hin zum anaphylaktischen Schock mit Kreislaufstillstand reichen können. Die Spättypreaktion wird pathophysiologisch durch antigenspezifische T-Zellen vermittelt (vgl. 1.2.4). Die Erkrankungen umfassen unterschiedliche Exantheme (makulopapulös, urtikariell etc.). Zudem gibt es noch seltenere klinische Erscheinungsbilder, die eine ernsthafte und lebensbe-

drohliche Verlaufsform annehmen können. Hierzu zählen die akute generalisierte exanthematische Pustulose (AGEP) (Sidoroff, Halevy et al. 2001; Halevy 2009), das DRESS (*drug rash with eosinophilia and systemic symptoms*)/DIHS (*Drug-induced hypersensitivity syndrome*)–Syndrom (Shiohara, Inaoka et al. 2006), das Stevens Johnson Syndrom (SJS), die toxisch epidermale Nekrolyse (TEN) (Bastuji-Garin, Rzany et al. 1993; French 2006; Borchers, Lee et al. 2008), das fixierte Arzneimittelexanthem, die Kontaktdermatitis auf topisch angewandte Arzneimittel und die spezifischen organischen Reaktionen (z.B. allergisch-hypererge Hepatitis).

Eine Arzneimittelreaktion kann sich unabhängig von den auslösenden Mechanismen in allen Organen abspielen. Die am häufigsten betroffenen Organe bei unerwünschten Arzneimittelreaktionen sind nach absteigender Reihenfolge Haut, Leber, Lunge, Kreislauf, blutbildendes System und Zentralnervensystem (Rozieres, Hennino et al. 2009). Nicht nur das Erscheinungsbild, sondern auch der Schweregrad der Symptome einer Arzneimittelallergie kann sehr unterschiedlich ausfallen. Medikamente, die am häufigsten eine Arzneimittelallergie hervorrufen, sind β -Lactamantibiotika, zu denen Penicilline und Cephalosporine gehören, aber auch Antiepileptika und Narkosemittel.

Bis zu 10% der Bevölkerung berichten in ihrer Anamnese, dass sie von einer Penicillinallergie betroffen sind. Bei Verdacht auf eine Penicillinallergie sollte, um eine theoretisch mögliche Kreuzreaktivität auf andere β -Lactamantibiotika zu vermeiden, eine andere Gruppe von Antibiotika zur Therapie eingesetzt. Hierzu gehören bspw. Makrolide, Flurorchinolone oder Glykopeptide. Die Anwendung dieser Antibiotika kann allerdings ein Problem darstellen, weil sie weniger wirksam sind, mehr Nebenwirkungen haben und vermehrt Resistenzen verursachen können (Comte, Petitpierre et al.). Weitere Studien zeigten, dass mindestens 75% bis 90% der Patienten mit Verdacht auf eine Penicillinallergie in Wirklichkeit β -Lactamantibiotika tolerierten (Seitz, Brocker et al.). Solange der Pathomechanismus der verschiedenen Typen der Arzneimittelallergie nicht ausreichend erklärt ist, können Allergologen im klinischen Alltag nur mutmaßen, dass es sich bei bestimmten Symptomen um eine Arzneimittelallergie handelt (Pichler, Yawalkar et al. 2002).

1.4 Epidemiologie allergischer Erkrankungen

Die Entwicklung von Allergien ist ursprünglich auf den komplexen Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und bestimmten Umwelteinflüssen zurückzuführen (Howard, Meyers et

al. 2000). Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat die Prävalenz von Allergien weltweit stetig zugenommen.

Allein an Asthma bronchiale sind mittlerweile weltweit ca. 300 Millionen Menschen erkrankt, wobei von den Erkrankten ca. 50% in Entwicklungsländern leben (Ruby, Collette et al. 2009). Des Weiteren leiden ca. 400 Millionen Menschen der Allgemeinbevölkerung an einer allergischen Rhinitis (Ruby, Collette et al. 2009). Jedoch ist die Zunahme von Allergien nicht in allen Ländern gleichmäßig verteilt, sondern steht in starker Abhängigkeit von Lebensart und Lebensraum. So sind bspw. Allergien in ländlichen Gegenden deutlich weniger vorhanden als in urbanen Regionen (Majkowska-Wojciechowska, Pelka et al. 2007; Pekkarinen, von Hertzen et al. 2007; Viinanen, Munhbayarlah et al. 2007). Als eine mögliche Antwort auf die Frage nach der Ursache dieses Phänomens wurde die sogenannte Hygiene-Hypothese formuliert (Strachan 1989). Die zunehmende Entwicklung und Veränderung im Gesundheitswesen und in unserer Umwelt haben in den zivilisierten Ländern zu einer Art „Sterilisierung“ der Lebensräume geführt. Das menschliche Immunsystem ist deshalb während der Kindheit mit immer weniger Antigenen von bakteriellen, parasitären und viralen Erregern konfrontiert. Diese zunehmende Sauberkeit übt gemäß der Hygiene-Hypothese einen negativen Einfluss auf die Entwicklung eines ausgewogenen Immunsystems aus und begünstigt die Entstehung von allergischen Erkrankungen (Garn and Renz 2007).

Der Rückgang der Infektionskrankheiten in einer Gesellschaft führt demnach gleichzeitig zu einer Zunahme an Allergien. Gestützt wird die Hygiene-Hypothese u.a. von epidemiologischen Daten. So wird seit Jahren versucht, auf verschiedenen Ebenen eine Korrelation zwischen der phänotypischen Vererbung, Umwelteinflüssen (z.B. Schadstoffbelastungen) und anderen Faktoren (z.B. Tabakkonsum oder Infektionen) für das Auftreten von Allergien zu finden (Halken 2004; von Mutius 2007). Bisher konnten Studien nur wenige Hinweise auf Allergie-auslösende Faktoren liefern. Sie zeigten jedoch präventive Mechanismen auf, die möglicherweise das Risiko einer allergischen Erkrankung reduzieren. So konnte gezeigt werden, dass ein früher Besuch von Kindertagesstätten, Infektionen in den ersten Lebensjahren, das Aufwachsen in unterdurchschnittlich hygienischen Bedingungen bzw. in großen Familien mit mehreren älteren Geschwistern sowie auch der regelmäßige Kontakt mit Tieren und der Natur die Funktion des Immunsystems unterstützt und einen schützenden Effekt bezogen auf Allergien aufzeigen (Kramer, Heinrich et al. 1999; Lewis 2000; Riedler, Eder et al. 2000; von Mutius 2007).

Die benannten Ausführungen beziehen sich insbesondere auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen vom Soforttyp, doch auch allergische Spättypreaktionen aufgrund einer Arzneimittelallergie nehmen zu. Eine schädliche und unerwartete Arzneimittelnebenwirkung vom Spättyp ist heute der Grund für 3-6% aller Krankenhausaufnahmen und macht ca. 10-15% aller hospitalisierten Patienten aus, was die Erhöhung sozioökonomischer Kosten zur Folge hat (Gomes and Demoly 2005). Zudem kommt es zu einer verstärkten Morbidität, verlängerten Krankenhausaufenthalten und zu einem erhöhten Risiko der Mortalität (Gomes and Demoly 2005). Der Großteil der derzeit vorhandenen epidemiologischen Studien befasst sich allerdings primär mit den schädlichen und unerwarteten Nebenwirkungen eines Arzneimittels und weniger mit den spezifischen Arzneimittelallergien (Demoly 2007).

Darüber hinaus besteht die Problematik, dass die aktuellen Studien unterschiedliche Grundvoraussetzungen haben, wodurch die Vergleichbarkeit begrenzt ist. Die meisten Studien setzen den Fokus auf bestimmte Populationsgruppen, wie bspw. stationär oder ambulant behandelte Patienten, Erwachsene oder Kinder sowie Patienten in spezialisierten Allergiezentren oder Allgemeinpraxen (Mockenhaupt, Viboud et al. 2008). Dementsprechend schwierig ist es, aus den vielen spezifischen Studien eine allgemeine Prävalenz und Inzidenz der Arzneimittelallergie zu erfassen. Dies ist bislang nur im Rahmen der einzelnen benannten Fallgruppen geschehen. So haben bspw. Studien ergeben, dass etwa 10-20% der hospitalisierten Patienten und etwa 7% der ambulanten Patienten von Arzneimittelreaktionen betroffen sind (Gomes and Demoly 2005). Andere Studien ermittelten Risikofaktoren für die Entstehung einer Arzneimittelallergie. Hierzu zählen neben den jeweiligen Arzneimitteln und ihrer Applikation auch patientenabhängige Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht, aktuelle Erkrankungen und die bisherigen Reaktionen auf verwandte Medikamente (Gomez, Torres et al. 2004). Im Rahmen der Arzneimittelreaktionen mit Betalactamantibiotika, insbesondere Penicillin G, aber auch Amoxicillin und Cephalosporinen, ist die Prävalenz in den letzten Jahren angestiegen. Dabei scheint diese in den verschiedenen Populationen - die Herkunft betreffend - unterschiedlich ausgeprägt zu sein (Gomez, Torres et al. 2004). Bezogen auf die Applikationsart des Arzneimittels beeinflusst die Dosierung und Verabreichung des Medikaments das Sensibilisierungsrisiko und somit die Häufigkeit des Auftretens einer Arzneimittelallergie. Die Veröffentlichung von Cetinkaya zeigte, dass eine intermittierende und wiederholte Applikation eines Medikaments eher eine Sensibilisierung als die kontinuierliche Verabreichung hervorruft (Cetinkaya and Cag 2004). Die Probanden, bestehend aus 147 Kindern, erhielten mindestens drei Mal innerhalb von 12 Monaten ein Betalactamantibiotikum. Bei den Kindern ergaben sich keine Anzeichen einer allergischen Reaktion. In 10,2% der Fälle lag jedoch ein

positiver Hauttest auf Penicillin vor, was der Autor der Studie auf die wiederholende Applikation des Betalactamantibiotikums und der hierdurch begünstigten Sensibilisierung zurückführte. Frühere Studien zeigten einen solchen Zusammenhang jedoch nicht auf (Pichichero and Pichichero 1998).

Eine andere Studie konnte zeigen, dass die topische Anwendung eines Arzneimittels eine Sensibilisierung förderte (Juan, Yang et al. 2004). Ein weiterer Risikofaktor ist die unterschiedliche Prädisposition. Studien belegten, dass Frauen häufiger Arzneimittelallergien entwickeln als Männer. Das Verhältnis liegt hier bei 65-70% zu 30-35% (Haddi, Charpin et al. 1990; Asero 1998; Barranco and Lopez-Serrano 1998; Thong, Leong et al. 2003). Neben dem Geschlecht scheint auch das Alter, der Reaktionstyp und das verabreichte Arzneimittel eine Rolle zu spielen. (Gomes, Cardoso et al. 2004; Gomez, Torres et al. 2004; Kidon and See 2004). Allerdings konnte eine Studie aus dem Jahr 2003 kein erhöhtes Risiko bei älteren Menschen feststellen. Vielmehr zeigten die Daten, dass Patienten, die das „65.“ Lebensjahr bereits überschritten hatten, nicht einem höheren Risiko ausgesetzt sind Arzneimittelallergien zu entwickeln als jüngere Patienten. Darüber hinaus scheint das Alter auch keine Auswirkung auf die Schwere der Symptome zu haben (Gomes and Demoly 2005).

Eine atopische Veranlagung für Reaktionen vom Spättyp und auch Soforttyp scheint kein Risikofaktor zu sein, sondern steht in Abhängigkeit zu dem eingenommen Medikament (Asero 1998; Ponvert, Le Clainche et al. 1999). Doch auch die in den o.g. Studien erlangten Ergebnisse, welche insbesondere auf der Epidemiologie der unerwarteten Nebenwirkung auf Arzneimittel beruhen, bedürfen einer sehr vorsichtigen Interpretation, da diese in der Regel weder genau klassifiziert noch sorgfältig bewiesen sind. So wird teilweise nicht zwischen immunologisch und nichtimmunologisch vermittelten Arzneimittelreaktionen differenziert (Thong, Leong et al. 2003). Dazu kommen zum einen fehlende Diagnosen, da nicht alle Fälle von allergischen Reaktionen gemeldet werden (Backstrom, Mjorndal et al. 2004; Mittmann, Knowles et al. 2004) und zum anderen „Überdiagnosen“, da der Begriff Allergie teilweise zu alltäglich und somit zu unspezifisch gebraucht wird (Messaad, Sahla et al. 2004).

Multizentrische Studien, sowohl in Krankenhäusern als auch außerhalb dieser, mit derselben Methodik sowie Terminologie und Definitionen könnten zu genaueren und wertvollen Ergebnissen bezüglich Risikofaktoren, möglicher regionaler Unterschiede und zur Implementierung geeigneter präventiver Maßnahmen für die betroffenen Patienten führen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es bisher nur wenig verlässliche epidemiologische Daten bezüglich Arzneimittelallergien gibt.

1.5 Pathophysiologie der Spättypallergie

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Pathomechanismen der Spättypallergie auf Betalactamantibiotika. Im Folgenden sollen die grundlegenden Immunmechanismen der Spättypallergie näher erläutert werden.

Das immunologische Phänomen einer Spättypreaktion wurde zum ersten Mal 1882 durch den Mediziner und Mikrobiologen Robert Koch beschrieben. Er extrahierte das Antigen Tuberkulin aus Stoffwechselprodukten der Tuberkulose-Bakterien. Landsteiner und Chase zeigten im Jahr 1940, dass es sich bei der Spättypreaktion um keine humorale, sondern um eine zellulär vermittelte Immunantwort handelt (Black 1999).

Die Haut ist das häufigste Manifestationsorgan einer Spättypreaktion. Primär- und Sekundärkontakt finden über die Haut statt (siehe Kapitel 1.3). Die typische Klinik ist das allergische Kontaktekzem mit Hautrötung, Schwellung, Bläschen und Krusten. Häufig bleibt die Überreaktion auf jene Stelle begrenzt, die mit dem Allergieauslöser in Kontakt stand.

In der Sensibilisierungsphase nehmen spezialisierte APZ der Haut, die epidermalen Langerhanszellen und dermalen dendritischen Zellen das Antigen auf und prozessieren es (Girolomoni and Pastore 2001). Das Antigen stellt meist eine niedermolekulare Verbindung dar, auch Hapten genannt, und wird erst durch die Bindung an Trägersubstanzen (körpereigene Proteine) zum Vollantigen (Basketter, Gerberick et al. 1998). Die APZ wandern nun mit dem von ihnen prozessierten und auf der Oberfläche präsentierten Antigen zu den regionalen Lymphknoten (Forster, Schubel et al. 1999). Hier induzieren sie allergenspezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Das Ergebnis dieser Sensibilisierung ist die Entstehung von Effektor-Gedächtnis T-Zellen. Diese Gedächtniszellen können dann in die Haut zurückwandern. Während der Auslösephase führt ein erneuter Kontakt mit dem Antigen dazu, dass die Gedächtnis-T-Zellen direkt in der Haut aktiviert werden (Girolomoni and Pastore 2001). Entsprechend setzen die T-Zellen dann inflammatorische Zytokine wie bspw. $IFN-\gamma$ und $IFN-\beta$ frei. Diese stimulieren zum einen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel und zum anderen erhöhen sie lokal die Durchlässigkeit der Blutgefäße. Dadurch können Plasma und inflammatorische Zellen in die Haut eindringen, es kommt zu einer sichtbaren Schwellung (Saint-Mezard, Berard et al. 2004; Janeway and M. Walport 2009). Durch die weitere Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen (u.a. auch durch Keratinozyten) kommt es zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, begleitet von einer Einwanderung von Monozyten und

weiteren T-Zellen (Janeway and M. Walport 2009). Die Auslösephase dauert in der Regel 24-48 Stunden.

1.6 Betalactamantibiotika

Betalactamantibiotika werden in vier Wirkstoffklassen unterteilt, Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme und Monobactame. Alle Betalactamantibiotika haben den Betalactamring gemein, welcher als antibakteriell aktives Zentrum dient (siehe Abb. 2) (Aktories 2009).

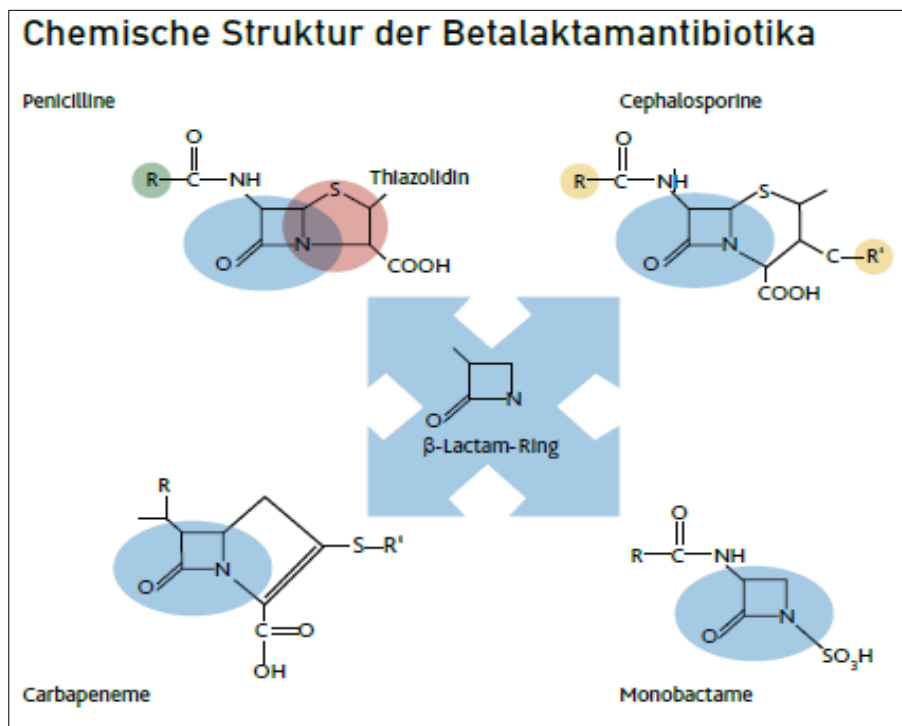


Abb. 2: Gemeinsames Merkmal der Betalactame ist der antibakteriell wirkende β -Lactamring, dieser kann durch Acylierung das aktive Zentrum von Zellwand aufbauenden Enzymen blockieren (Wantke and Wöhrle 2008; Chaabane, Aouam et al. 2009).

Der Angriffsort der Betalactamantibiotika sind die bakteriellen Zellwände. In den Zellwänden befinden sich so genannte Peptidoglykansynthetasen (Mureinsynthetasen). Diese fungieren als Transpeptidasen, welche Glykanstränge durch kurze Peptidstücke quervernetzen und somit die Stabilität der Bakterienzellwand gewährleisten. Kommt es zu einer Anlagerung des Betalactamantibiotikums an die Bakterienzellwand wird das Enzym durch Spaltung des Betalactamrings acyliert. Hierdurch entsteht eine kovalente Bindung des Antibiotikums mit irreversibler Hemmung des Enzyms. Auf diese Weise kann es entweder zu einer filamentösen Deformierung des Bakteriums kommen oder es resultiert ein so großer Defekt in der Zellwand, dass ein hoher osmotischer Druck im Inneren des Bakteriums entsteht, so dass die

Cytoplasmamembran durch den Defekt austritt und dann zerreißt (bakterizider = abtötender Wirkmechanismus) (Aktories 2009).

Die antibakterielle Aktivität der Betalactamantibiotika ist vor allem von den nachfolgend aufgeführten drei Faktoren abhängig (Aktories 2009).

Penetrationsgeschwindigkeit: Um zu den Zielenzymen zu gelangen, muss das Betalactamantibiotikum die bakterielle Zellwand und den periplasmatischen Raum passieren. Hierbei hängt die Penetrationsgeschwindigkeit von der Beschaffenheit der Mureinschicht ab, wobei grampositive Bakterien eine dickere Mureinschicht aufweisen als gramnegative Bakterien.

Wirkortaffinität: Die spezifischen Zielstrukturen der Betalactamantibiotika sind die bakteriellen Mureinsynthetasen, auch „PBP“ (Penicillin-bindende-Proteine) genannt. Kommt es zu einer bevorzugten Bindung an die PBP, so entsteht eine hohe antibakterielle Aktivität und bakterizide Potenz.

Betalactamasestabilität: Der häufigste Resistenzmechanismus des Bakteriums gegen Betalactamantibiotikum ist die Produktion des Betalactamaseenzyms. Dies spaltet die Betalactambindung hydrolytisch und inaktiviert das Antibiotikum.

1.7 Diagnostik der Spättypreaktion

An erster Stelle der Allergiediagnostik steht die Anamnese. Die Angaben des Patienten über Lebensgewohnheiten sowie Zusammenhänge zwischen dem Auftreten der allergischen Beschwerden und bspw. Jahreszeit, Tätigkeiten, Räumlichkeiten, Nahrungsmitteln, Medikamentengebrauch usw. können helfen bestimmte Stoffe als mögliche Allergene einzugrenzen. Zur Abschätzung des persönlichen Allergierisikos und um Hinweise auf eine etwaige Atopie zu erlangen, wird anhand der Anamnese überprüft, ob Allergien im Familienkreis (Eltern, Geschwister, Kinder) bestehen oder ob in der Vergangenheit eine allergische Reaktion bei dem Patienten selbst aufgetreten ist (Moll 2010). Des Weiteren können auch standardisierte Fragebögen oder Allergietagebücher eine Möglichkeit sein, die Diagnose einer Allergie zu stützen (Niggemann; Niggemann 2010).

Allergien, die direkt nach Allergenkontakt eine Hypersensitivitätsreaktion zeigen, sind in den meisten Fällen einfach zu diagnostizieren. Kommt es allerdings wie im Rahmen einer Spättypreaktion zu einer verzögerten Reaktion, treten die Beschwerden unregelmäßig auf bzw. liegen mehrere Allergien gleichzeitig vor, ist es schwerer die Diagnose zu stellen. Deshalb

schließen sich an die Anamnese verschiedene Untersuchungen an. Hierzu zählen der klinische Befund, Hauttestungen, Labordiagnostik und Provokationstests. Zu den Hauttests gehören der Prick-, Intrakutan-, Scratch- und Reibtest (Carr and Saltoun; Carr and Saltoun 2012).

Der diagnostische Nachweis einer Spättypreaktion auf Betalactamantibiotika mittels Intrakutan- und Epikutantest wird schon seit vielen Jahren genutzt und hat eine Sensitivität von 2,6%-37,8% (Lammintausta and Kortekangas-Savolainen 2005). Goldstandard zur Diagnostik einer Typ-IV-Allergie ist der Epikutantest (sogenannter Pflastertest) (Yoshihisa and Shimizu; Hansen and Kroon 2008). Er kann mit standardisierten Einzelsubstanzen, aber auch mit handelsüblichen Medikamenten durchgeführt werden (Barbaud 2005). Im Epikutantest werden die aufgrund der Krankengeschichte als auslösende Allergene verdächtigten Substanzen in geringer Konzentration in kleine Testkammern (Aluminiumplättchen, so genannte „*Finn Chambers*“) gegeben und in der Regel paravertebral rechts und links am Rücken für 24-48 Stunden auf die Haut geklebt. Die Auswertung erfolgt dann nach 48 und 72 Stunden (Meves 2006). Kommt es zu einer immunologischen Spättyp-Reaktion und somit einem positiven Testergebnis, bildet sich unter der jeweiligen Kammer eine Rötung (Erythem) mit Bläschen oder Papeln aus. Hierbei wird die Stärke der Reaktion anhand einer internationalen Skala in unterschiedliche Grade eingestuft (Uter, Hegewald et al. 2005).

Der Lymphozytentransformationstest (LTT) kann ggf. zur Ergänzung oder wenn der Epikutantest aufgrund einer Kontraindikation nicht durchführbar ist durchgeführt werden (Bircher 2007). Nach Blutentnahme werden im ersten Schritt durch Zentrifugation und mehrere Waschvorgänge die Lymphozyten von den restlichen Blutzellen des Patienten getrennt. Danach wird eine Nährlösung und das zu testende Antigen zu den Lymphozyten hinzugegeben und die Lymphozytenkultur einige Tage unter optimalen Wachstumsbedingungen im Inkubator stengelassen. Zusätzlich wird auch eine Kontrollprobe ohne Antigenzusatz durchgeführt. Die letzten 16 Stunden vor der Auswertung wird radioaktiv-markiertes Thymidin hinzugeführt, das in die Antigen-stimulierten, proliferierenden Lymphozyten während der Zellteilung eingebaut wird. Danach wird die Radioaktivität der Lymphozytenkultur gemessen und ein Stimulationsindex berechnet. Dieser gibt Auskunft darüber, ob in der mit Antigen versehenen Blutprobe spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten vorhanden sind (Pichler and Tilch 2004; Bircher 2007).

1.7.1 Orale Provokationstestung (OPT)

Nicht immer lässt sich durch die vorbeschriebenen Tests eine allergische Spättypreaktion diagnostizieren. Eine Reihe von Patienten können nur mittels OPT eine gesicherte Diagnose

gestellt bekommen (Aberer, Bircher et al. 2003). Die OPT ist die zuverlässigste Methode, um eine Arzneimittelreaktion nachzuweisen (Torres, Mayorga et al. 2009). In der Durchführung erfolgt unter stationärer Beobachtung die Einnahme des vermeintlich allergieauslösenden Medikaments. Die OPT wird nicht immer empfohlen und kann in manchen Fällen sogar kontraindiziert sein. Zu den Kontraindikationen zählen schwere allergische Reaktionen wie die AGEP, SJS, TEN, systemische Vaskulitis, spezifische Organmanifestationen (Hepatitis, Nephritis, Pneumonitis) und medikamenteninduzierte Autoimmunerkrankungen (Aberer, Bircher et al. 2003). Die am häufigsten untersuchten Medikamente in einer OPT sind Betalactamantibiotika (Terrados, Blanca et al. 1995; Aberer, Bircher et al. 2003).

In einer Studie mit Patienten, die unter einer Einnahme von Betalactamantibiotika eine exanthematische Reaktion entwickelten, konnte gezeigt werden, dass häufig ein negativer Hauttest vorlag und die OPT toleriert wurde (Padilla, Ferriols et al. 2007), so dass sich der Verdacht auf eine Arzneimittelallergie oft nicht bestätigt. Andererseits lässt sich eine Arzneimittelallergie oft erst durch eine OPT nachweisen. Das zeigt, dass die OPT ein wichtiger Baustein für die Diagnose einer Spättypallergie auf Betalactamantibiotika ist, falls der Epikutantest negativ ausfällt (Aberer, Bircher et al. 2003).

1.7.2 Immunhistochemie

Eine weitere Möglichkeit Spättypreaktionen zu untersuchen ist die immunhistochemische Analyse. In den meisten Fällen einer Spättypreaktion ist die Haut das betroffene Zielorgan. Hierfür kann eine Biopsie der Haut entnommen und analysiert werden. Die Untersuchungen helfen dabei, die zugrunde liegenden immunologischen Mechanismen besser zu verstehen. Zeichen einer T-zellulären Spättypreaktion sind mononukleäre Zellinfiltrate aus aktivierten T-Zellen. Die T-Zellen bilden unterschiedliche Aktivierungsmarker (CD69, CD25 und HLA-DR) aus, ca. 20% sezernieren Perforin, Granzym B und IL-12 (Mayorga, Pena et al. 2006). Je nach klinischem Erscheinungsbild zeigen sich weitere immunologische Befunde (Gomez, Torres et al.; Gomez, Torres et al. 2012). So liegen bei einem makulopapulösem Exanthem in der papillären Dermis perivaskuläre mononukleäre Zellinfiltrate mit einer hohen Anzahl von eosinophilen Zellen vor. Im Gegensatz dazu sind bei einem SJS oder TEN vermehrt tote Keratinozyten mit kleineren T-Zellinfiltration zu sehen (Mayorga, Torres et al. 2009; Torres, Mayorga et al. 2009). Im immunhistochemischen Bild der AGEP liegen vermehrt Keratinozyten vor, die IL-8 produzieren, das zur Rekrutierung von neutrophilen Zellen in die Epidermis führt (Sidoroff, Halevy et al. 2001; Pichler, Yawalkar et al. 2002; Schaerli, Britschgi et al. 2004).

1.8 T-Lymphozyten im Zusammenhang einer Spätypallergie

Eine zentrale Rolle im Pathomechanismus der Spätypallergie auf zellulärer Ebene nehmen die T-Lymphozyten ein. Anhand charakteristischer Merkmale, wie sezernierter Markerzytokine und deren Funktionen, können verschiedene Subtypen an T-Zellen im humanen Immunsystem voneinander unterschieden werden, dies wird im Folgenden genauer erläutert.

1.8.1 T-Helferzellen

Die T-Zellentwicklung findet im Wesentlichen im Thymus statt. Hier werden die T-Zellen selektioniert und verlassen den Thymus als so genannte naive T-Zellen. In den sekundären lymphatischen Organen werden die naiven T-Zellen dann von APZ und den von diesen Zellen präsentierten spezifischen Antigen aktiviert. Die Antigenerkennung ist ein relativ komplexer Prozess, da ein Peptid nur dann erkannt werden kann, wenn es über einen MHC den TCR präsentiert wird. T-Helferzellen, die das CD4 auf der Oberfläche exprimieren, erkennen das Antigen in Kombination mit den Klasse-2-Molekülen des MHC. Die zytotoxischen T-Lymphozyten, die CD8 exprimieren, erkennen die Peptide über die MHC Klasse-1-Moleküle (Klimek and Bottcher 2008). Kommt es zu einer Bindung des Antigens an den entsprechenden TCR bei $CD4^+$ -Zellen, führt dies in Abhängigkeit von der Art der Immunantwort zur Entwicklung und Differenzierung von zwei funktionell unterschiedlichen Th-Zellpopulationen, den Typ1 (Th1)-Zellen oder Typ2 (Th2)-Zellen.

Bereits 1986 konnten Mosmann und dessen Mitarbeiter diese unterschiedlichen Th-Zellpopulationen in Mäusen feststellen, einige Jahre später wurden die Th-Zellen vom Typ1 (Th1) und Typ2 (Th2) auch im Menschen identifiziert (Romagnani 1991; Mosmann, Cherwinski et al. 2005). Th-Zellen vom Typ 1 und 2 sind für zwei konträre Formen der $CD4^+$ -Th-Zell-vermittelten Immunantwort zuständig. Wird eine Immunantwort ausgelöst, sezernieren Th-0-Zellen (naive T-Zellen) hauptsächlich das Zytokin IL-2, welches autokrin die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen stimuliert (Rainer 2001). In Gegenwart der Zytokine IFN- γ und IL-12 entwickeln sich naive T-Zellen zu Th-1-Zellen, Th-2-Zellen werden in Gegenwart von IL-4 und IL-6 gebildet. Die Zytokine der Th1- bzw. Th2-Zellen wirken reziprok inhibitorisch auf Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktion des jeweils anderen und stimulieren notwendige Wachstumsfaktoren des eigenen T-Zellphänotyps. Die Differenzierung spezialisierter Th-Populationen erfordert somit ein komplexes Zusammenspiel von in-

strukturellen Zytokinen und deren Transkriptionsfaktoren sowie die Expression von Zytokinrezeptoren (Schulz, Mariani et al. 2009).

Aktuell wird eine Dysregulation von Th1- bzw. Th2-Antworten für die Entstehung oder Begünstigung einiger Krankheitsbilder angesehen. So werden Th1-Zellen als pathophysiologisch bedeutsam für verschiedene Autoimmunerkrankungen oder die allergische Überempfindlichkeitsreaktion vom Spättyp angesehen, wohingegen bei dominanter Th2-Antwort die Entwicklung einer Soforttypallergie begünstigt werden kann (Ando, Clayton et al. 1989; Campbell, Kay et al. 1991; Robinson, Hamid et al. 1992; Del Prete, De Carli et al. 1993; Romagnani 2006).

1.8.1.1 Th1-Zellen und deren assoziierte Zytokine

Die Th1-Zellen sind hauptsächlich für die zellvermittelte spezifische Immunantwort verantwortlich (Murphy and Reiner 2002). Sie sind überwiegend durch die Expression der Zytokine IFN- γ , IL-2, IL-12 und TNF- α charakterisiert (Peterson). Die initiale Polarisierung zur Th1-Zelle aus einer naiven Th0-Zelle wird zum einen durch einen starken TCR (T-Zellrezeptor)-Stimulus und zum anderen durch die Anwesenheit von IL-2 und IL-12 begünstigt (Pochard, Gosset et al. 2002). Der IFN- γ Rezeptor STAT1 wird aktiviert und die Expression des Transkriptionsfaktors T-bet initiiert. T-bet aktiviert wiederum durch die direkte Bindung an den Promoter die Bildung von IFN- γ und der β 2-Kette des IL-12-Rezeptors (IL-12 β 2) (Afkarian, Sedy et al. 2002; Mullen, Hutchins et al. 2002).

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors T-bet in der Regulation der Th1-Differenzierung wurde in einer Studie mit T-bet defizienten Mäusen festgestellt. Es wurde herausgefunden, dass die Mäuse eine spontane Atemwegserkrankung entwickelten, ähnlich dem Asthma bronchiale beim Menschen, mit zusätzlicher Lungeneosinophilie und bronchialer Überempfindlichkeitsreaktion (Finotto, Neurath et al. 2002). Die primär im Mausmodell beobachteten Ergebnisse konnten beim Menschen bestätigt werden, denn in den Untersuchungen von Asthmapatienten wurde neben dem ungewöhnlich niedrigen T-bet-Expressionslevel eine Tendenz in Richtung Th2-Polarisierung mit Überproduktion von Th2-Zytokinen beobachtet (Munthe-Kaas, Carlsen et al. 2008).

Die von Th1-Zellen sezernierten Zytokine werden aufgrund ihrer entzündungsinduzierenden Wirkung auch proinflammatorische Zytokine bezeichnet. Durch die Th1-zellvermittelte Phagozytose und zytotoxische Immunabwehr insbesondere bei intrazellulären Pathogenen kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die oft mit Gewebsschäden einhergeht.

Das Markerzytokin IFN- γ wird hauptsächlich von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und von NK-Zellen synthetisiert. Die spezifischen IFN- γ Rezeptoren werden auf allen humanen Zellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert. Mittels der Bindung von IFN- γ wird die Proliferation von NK-Zellen gefördert und mit Hilfe von IL-2 die Entstehung von CD8⁺ Lymphozyten zu zytotoxischen Effektorzellen angeregt (Romagnani, Maggi et al. 1991). Die Kombination von IFN- γ und TNF- α induziert die Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Entzündung. Des Weiteren fördert IFN- γ die Produktion opsonierender Immunglobulin G-(IgG)-Subklassen in B-Lymphozyten. Durch die Bindung der Immunglobuline an zytotoxische Effektorzellen und an Komplementfaktoren wird die Phagozytose und Lyse der opsonierten Zellen initiiert (Romagnani 1994; Abbas, Murphy et al. 1996).

Das Zytokin IL-12 wird nach (Infekt-induzierter) Stimulation von Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und neutrophilen Granulozyten gebildet. Die spezifischen IL-12-Rezeptoren befinden sich auf aktivierten peripheren Blutmonozyten, CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen. IL-12 fördert die CD4⁺ T-Zellantwort und vermittelt die Aktivierung und Proliferation von NK-Zellen. Zusammen mit TNF- α stimuliert IL-12 die NK-Zellen und sorgt dafür, dass große Mengen an IFN- γ gebildet werden, wodurch wiederum die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und T-Helferzellen verstärkt wird. Umgekehrt wird die Expression von IL-12 durch IFN- γ gefördert und durch IL-4 und IL-10 aus Th2-Zellen gehemmt. Somit ist IL-12 für die Regulation des Gleichgewichts von zellulärer und humoraler Immunität von großer Bedeutung. (Cruse, Bartling et al. 1995; Oppenheim and Fujiwara 1996).

1.8.1.2 Th2-Zellen und deren assoziierte Zytokine

Die Th2-Zellen haben eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung IgE-vermittelter, allergischer Soforttyp-Erkrankungen (Hebenstreit, Luft et al. 2003). In Anwesenheit von IL-4 differenzieren naive T-Zellen sich zu Th2-Zellen und produzieren die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13. Aktivierte Th2-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen CD40-Liganden, durch den sie über das membranständige CD40 Membranprotein in Kontakt mit B-Lymphozyten treten können (Hebenstreit, Luft et al. 2003). Die Interaktion von CD40 und CD40-Ligand in Kombination mit den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-13 stimuliert die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen, sowie den Immunglobulinklassenwechsel von IgG zu IgE (Bonney, Gauchat et al. 1996). Nachdem die IgE-Antikörper an ihren spezifischen Rezeptor (Fc ϵ RI) auf Mastzellen, aber auch auf basophilen und eosinophilen Granulozyten gebunden haben, ist die allergische Sensibilisierungsphase abgeschlossen (vgl. 1.2.1).

IL-4 wird hauptsächlich von Th2-Lymphozyten sezerniert, aber auch von Thymozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten (Nelms, Keegan et al. 1999). IL-4 und IL-13 sind für die oben beschriebene Induzierung der IgE-Synthese in B-Zellen verantwortlich und stimulieren die Expression des niedrigaffinen IgE-Rezeptors FcεRII (CD23) und des hochaffinen IgE-Rezeptors (FcεRI). Des Weiteren aktivieren beide Zytokine die lokale Produktion von proinflammatorischen Chemokinen wie Eotaxin und bewirken dadurch neben der Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel die Gewebseinwanderung von inflammatorischen Zellen. Zudem wird durch IL-4 und IL-13 eine vermehrte Produktion von Mukus in den Becherzellen der Atemwege ausgelöst (Dabbagh, Takeyama et al. 1999).

In unterschiedlichen Untersuchungen zeigte sich, dass die Abwesenheit oder auch Hemmung der Zytokine IL-4 und IL-13 die Induktion allergischer Soforttyp-Erkrankungen erschwerte. So wurde bei Mäusen festgestellt, dass durch Abwesenheit von IL-4 ein verminderter IgE-Spiegel vorhanden war, eine reduzierte Einwanderung von Eosinophilen und eine niedrige Expression des Adhäsionsmoleküls VCAM-1. In Asthamamodellen führte die Neutralisierung von IL-13 zu einer verringerten Reaktivität der Atemwege und zu einer Abnahme der mukusproduzierenden Becherzellen (Blease, Jakubzick et al. 2001). Zudem konnte in einer Reihe von Modellen für Asthma und Parasiteninfektionen gezeigt werden, dass die Hemmung von IL-13 folgenreicher ist als die Hemmung von IL-4. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass die IL-4-Expression nur transient stattfindet und die Produktion nach einigen Stunden ihren Höhepunkt erreicht, wohingegen IL-13 wesentlich länger exprimiert wird. Somit ist IL-13 ein dominierendes Zytokin in Th2-Zell-induzierten Prozessen wie Asthma bronchiale, aber auch Parasitosen (Wills-Karp, Luyimbazi et al. 1998; Wills-Karp 2001).

Ein weiteres entscheidendes Zytokin Th2-mediierter Immunreaktionen ist IL-5, das an Rezeptoren auf eosinophilen und basophilen Granulozyten bindet. Dort verstärkt es die Differenzierung und Aktivierung beider Zelltypen (Hirai, Yamaguchi et al. 1990). Die toxischen Proteine, die von den eosinophilen Granulozyten freigesetzt werden, führen nicht nur zur Parasitenabwehr, sondern im Fall einer allergischen Erkrankung auch zu einer Schädigung des Gewebes (Gundel, Letts et al. 1991).

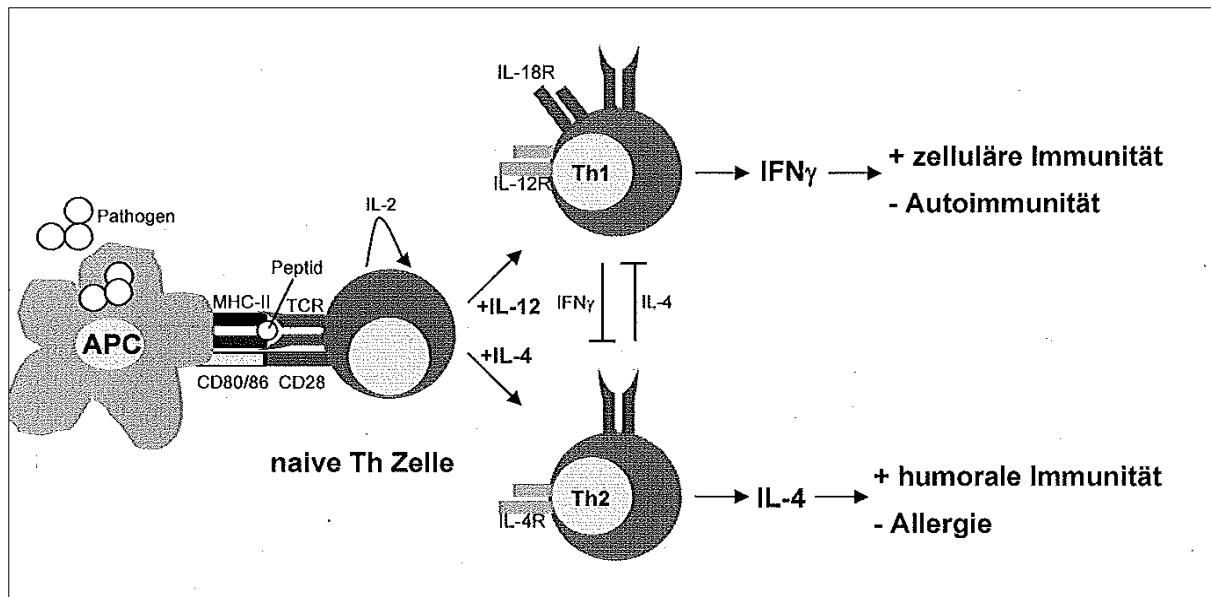


Abb. 3: Aktivierung und Polarisierung von (n)-Th-Zellen nach Antigenkontakt. Nach Allergenpräsentation durch eine APZ und die Peptiderkennung durch die naive (Th0)-Zelle kommt es in Gegenwart von Interleukin (IL)-4 zu einer Th-2-gerichteten Differenzierung (Aktivierung von GATA 3), wohingegen IL-12 zu einer Polarisierung in Richtung Th1-Zellen fördert (Aktivierung von T-bet1). Th1- und Th2-Zellen können sich reziprok hemmen.

1.8.1.3 Weitere T-Zellsubpopulationen

Neben den klassischen zwei Subtypen von Th-Zellen, die 1989 von Mosmann et al. mit ihrem Th1- und Th2-Paradigma beschrieben wurden, sprechen neuere Daten für die Existenz weiterer Th-Populationen, die eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen oder Allergien spielen können (Mosmann and Coffman 1989). Hierzu zählen die Th17-Zellen (Bettelli, Korn et al. 2008), die durch die Zytokine IL-6, IL-23 und den transformierenden Wachstumsfaktor TGF- β (*transforming growth factor*- β) induziert werden und die unter anderem IL-17A, IL-22, IL-21 und IL-17F sezernieren (Bettelli, Carrier et al. 2006; Mangan, Harrington et al. 2006; Korn, Oukka et al. 2007; Korn, Bettelli et al. 2009). Zahlreiche Studien weisen auf eine proinflammatorische Funktion von Th17-Zellen hin, möglicherweise spielen sie auch eine Rolle bei der Ausbildung einer AGEF (Iwakura, Nakae et al. 2008).

1.8.2 Regulatorische T-Zellen

Die Regulation des Immunsystems erfordert eine sensible Balance zwischen der Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber dem Selbst und der Fähigkeit zur Auslösung einer protektiven Immunantwort gegenüber pathogenen Fremdanitigenen. Bereits Anfang der 70er Jahre wurde vermutet, dass der Mechanismus der peripheren Toleranz durch so genannte Suppressorzellen aufrechterhalten wird, die autoreaktive T-Zellen aktiv unterdrücken. Jedoch

erst 1995 konnten Sakaguchi et al. den überzeugenden Nachweis einer Population von $CD4^+CD25^+$ T-Zellen liefern, die eine aktive supprimierende Eigenschaft aufweisen (Sakaguchi 2005). Seither werden die vormals als Suppressorzellen bezeichneten immunregulatorischen T-Zellen auch als Treg-Zellen bezeichnet (Neumann-Haefelin, Spangenberg et al. 2004).

Es zeigte sich, dass diese Zellpopulation eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems, der Verhinderung von Autoimmunreaktionen und bei der Kontrolle von Abwehrreaktionen gegenüber infektiösen Pathogenen sowie gegen Tumore spielt (Sakaguchi 2004). Die Untersuchungen der letzten Jahre ergaben, dass die supprimierende Fähigkeit der T-reg Zellen sich auf unterschiedliche Zellpopulationen bezieht. Hierzu zählen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen sowie B-Lymphozyten. Weiterhin wurde versucht in den letzten Jahren unterschiedliche T-reg Zellpopulationen anhand ihrer spezifischen Immunmechanismen in einzelne Subpopulationen zu klassifizieren und diese detaillierter zu charakterisieren, um sie besser voneinander abgrenzen zu können (Ng, Duggan et al. 2001; Shevach, McHugh et al. 2001).

1.8.2.1 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorische T-Zellen

Der größte Anteil der Treg Zellen findet sich nach heutigem Kenntnisstand innerhalb der Population der $CD4^+$ T-Zellen. Ein Merkmal vieler regulatorischer T-Lymphozyten ist die Expression des IL-2-Rezeptors. Die α -Kette dieses Rezeptors stellt den Oberflächenmarker CD25 dar (Sakaguchi, Sakaguchi et al. 1995; Humrich and Riemekasten 2006). Allerdings wird dieser Aktivierungsmarker CD25 von unterschiedlich aktivierten T-Zell-Subtypen gebildet, sodass der alleinige Nachweis von CD25 keine exakte Identifikation dieser Treg-Zellpopulation erlaubt.

Die $CD4^+CD25^+$ Treg-Subpopulation weist zusätzlich die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box P3* (Foxp3) auf. Das Molekül FOXP3 ist nicht nur ein Marker zur Identifikation von T-regulatorischen Zellen, es spielt auch eine entscheidende Rolle für die Entstehung und Funktion dieser Zellen (Polansky and Huehn 2007). Die molekulare Wirkungsweise des Transkriptionsfaktors beruht zum einen auf der Bindung von DNS im Zellkern, um die Expression von Proteinen zu stimulieren, die in den Treg-Zellen gebraucht werden. Zum anderen hat der Transkriptionsfaktor eine Repressorfunktion. Durch diese Funktion wird verhindert, dass in aktivierten Tregs-Zellen Effektormoleküle von konventionellen T-Zellen, wie proinflammatorische Zytokine, induziert werden (Zheng and Rudensky 2007).

In einer Untersuchung im Jahr 2001 konnte durch eine molekulargenetische Analyse die so genannte Scurfy-Maus charakterisiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Maus eine Frameshift-Mutation im FOXP3-Gen hat, die dazu führte, dass es zu einem sofortigen Abbau der FOXP3 Moleküle kommt (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Vergleichbare Mutationen wurden bei Patienten gefunden, die unter einer schweren polyendokrinen Autoimmunerkrankung leiden, dem so genannten IPEX-Syndrom (Torgerson and Ochs 2007). In späteren Studien zeigte sich, dass der Transkriptionsfaktor FOXP3 vor allem in $CD25^+CD4^+$ Treg-Zellen exprimiert wird und dass eine Überexpression von FOXP3 eine immunsuppressorische Eigenschaft in T-Zellen bewirkt (Hori, Takahashi et al. 2003). Aktuell gibt es keinen direkten Beweis, dass aufgrund einer defekten Funktion von FOXP3 eine allergische Erkrankung entsteht. Allerdings zeigte eine Studie, dass einzelne Nukleotidpolymorphismen von FOXP3 mit der Entwicklung einer Allergie im Kindesalter im Zusammenhang stehen könnten (Bottema, Kerkhof et al.). Dies muss aber durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Weitere Oberflächenmoleküle, die auf den $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Treg-Zellen gefunden wurden und die sich dadurch von anderen Zellpopulationen abgrenzen, sind CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*), sowie GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*). Diese beiden Oberflächenmoleküle haben eine wichtige Funktion für die supprimierende Eigenschaft dieser Population (Khattari, Cox et al. 2003).

Die $CD4^+CD25^+$ Population macht ca. 5-10% aller $CD4^+$ T-Zellen bei gesunden Individuen im peripheren Blut aus (Humrich and Riemekasten 2006). Die $CD4^+CD25^+$ T-reg Zellen entstehen wie andere T-Zellpopulationen im Thymus aus eingewanderten Vorläufer-T-Zellen des Knochenmarks und entwickeln sich bereits in den ersten Tagen nach der Geburt (Humrich and Riemekasten 2006). Die reifen, natürlichen (n)Treg-Zellen verlassen sodann den Thymus und zirkulieren in andere lymphatische Organe in der Peripherie (Liu, Putnam et al. 2006). Sie weisen keine Antigenspezifität auf. Gegenüber den natürlichen $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen, die im Thymus entstehen, gibt es noch eine andere $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-Population, welche den gleichen Phänotyp wie die (n)Treg-Zellen besitzt, aber erst in der Peripherie zu den „adaptiven“ T-reg Zellen heranreifen. Hierfür werden natürliche $Foxp3^-$ -T-Zellen, die im Thymus selektioniert werden, durch eine spezifische Antigenstimulation in der Peripherie zu Antigen-spezifischen $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ aktiviert (Sakaguchi 2003; Curotto de Lafaille and Lafaille 2009).

Treg Zellen entfalten ihre immunregulatorischen Funktionen durch komplexe Kontrollmechanismen. Zum einen werden potentiell autoreaktive T-Lymphozyten im Thymus selektioniert

und zerstört (klonale Deletion, zentrale Toleranz), zum anderen kommt es zu einer funktionellen Inaktivierung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie (Anergie, periphere Toleranz) und dadurch zur Verhinderung einer Autoimmunität. Letztendlich kennzeichnet sich die beschriebene Population auch dadurch aus, dass sie ihre supprimierende Wirkung auf andere CD4⁺ T-Zellen übertragen können, dieser Mechanismus wird als „infektiöse Toleranz“ bezeichnet (Dieckmann, Bruett et al. 2002). Diese Eigenschaft wird hauptsächlich durch eine Stimulation zur Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF- β vermittelt. Diese Zytokine verhindern die Aktivierung von APZ, wodurch eine zusätzliche Suppression erfolgt (Polansky and Huehn 2007).

1.8.2.2 Die Rolle von regulatorischen T-Zellen im Rahmen allergischer Erkrankungen

Bei allergischen Immunantworten kommt es zu einer vermehrten Bildung von Th1 oder Th2-Zellen und somit zu einem Ungleichgewicht des spezifischen Immunsystems. Diese T-Zell-Phänotypen sind am Pathomechanismus unterschiedlicher Allergien beteiligt. So kommt es durch die Aktivierung Allergen-spezifischer Th2-Zellen zur Bildung von hohen Mengen an IL-4, IL-5 und IL-13. Hierdurch werden IgE-produzierende B-Lymphozyten und die Effektorzellen der allergischen Entzündungsreaktion aktiviert. Mit zunehmender Chronifizierung der Allergie differenzieren sich dann auch Th1-Zellen, die für die Produktion von IFN- γ , TNF- α und TNF- β verantwortlich und an der Zerstörung des Gewebes im Organ beteiligt sind (Akdis, Verhagen et al. 2004; Trautmann, Kruger et al. 2005).

Die Treg Zellen haben unterschiedliche Fähigkeiten, die Entstehung einer Allergie zu verhindern (Palomares, Yaman et al. 2010). Durch die direkte Hemmung der aktivierten allergen-spezifischen Th2-Zellen, kommt es zur Reduzierung der Produktion der Th2- Zytokine (IL-4, IL-5, IL-13), welche essentiell an der Effektorphase von allergischen Reaktionen beteiligt sind (Akdis, Verhagen et al. 2004; Akdis and Akdis 2009). Weiterhin haben Treg-Zellen antiinflammatorische Eigenschaften, indem sie indirekt Einfluss auf die Entwicklung des tolerogenen Phänotyps der DZ nehmen (Wing, Onishi et al. 2008). Zudem kontrollieren Treg Zellen die allergische Entzündungsreaktion, indem sie Mastzellen, basophile und eosinophile Zellen supprimieren. Außerdem blockieren sie den zytokin-abhängigen Einstrom von T-eff-Zellen in das entzündliche Gewebe (Gri, Piconese et al. 2008; Nonaka, Ogihara et al. 2008). Ein wichtiger weiterer Mechanismus ist das Abschwächen der Induktion von Th1-Zellen und somit das Verhindern einer Apoptose von Keratinozyten und Bronchialzellen, welche ansonsten eine Gewebsentzündung fördern würde (Trautmann, Akdis et al. 2000; Akkoc, de Koning et al. 2008). Zusätzlich können Treg Zellen auf direktem Weg B-Zellen beeinflussen und die

Produktion von IgG4 fördern (Meiler, Klunker et al. 2008). In unterschiedlichen Studien konnte gezeigt werden, welche Bedeutung eine Dysfunktion von Treg Zellen in allergischen Erkrankungen hat. So kommt es nicht nur zur Ausbildung des bereits oben beschriebenen IPEX-Syndroms (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomale Vererbung), sondern auch die Manifestation atopischer Erkrankungen kann begünstigt sein (atopisches Ekzem, Nahrungsmittelallergien, Asthma, Rhinokonjunktivitis allergica) (Stock, Rolinck-Werninghaus et al. 2007). Somit können Foxp3 exprimierende Treg-Zellen nicht nur Autoimmunerkrankungen verhindern, sondern auch die Rückbildung allergischer Erkrankungen positiv beeinflussen (Stock, Rolinck-Werninghaus et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass T-Zellen, welche TGF- β sezernieren, einen hemmenden Einfluss auf die Entstehung einer Atemwegshyperreagibilität haben und dadurch eine allergische Atemwegsentszündung verhindern können. Diese Untersuchungen stützen somit die Hypothese, dass Treg-Zellen die Entwicklung einer allergischen Erkrankung verhindern können (Stock, Rolinck-Werninghaus et al. 2007).

1.8.2.3 Adaptive und induzierte T-regulatorische Zellen

Die meist verbreitesten Typen von adaptiven bzw. induzierten Tregs sind die Tr1- und Th3-Zellen (Peterson). Die Tr1-Zellen zeigen ein schwaches Proliferationsverhalten, sie sezernieren das immunsuppressive IL-10 und TGF- β (Fujio, Okamura et al.; Roncarolo, Gregori et al. 2006). In einer Untersuchung mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass antigenspezifische Tr1-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen supprimieren und somit die Entwicklung einer experimentellen Kolitis verhindern konnten. Weiterhin konnten Tr1-Zellen antigenspezifische Immunantworten unterbinden und die pathologische Funktion von autoantigenspezifischen Th1-Zellen und Th2-Zellen inhibieren (Stock, Rolinck-Werninghaus et al. 2007). Das Zytokin IL-10 führt zur T-Zelltoleranz, einer verminderten IgE-Produktion und zu einer gesteigerten IgG-4 Synthese. Der immunsuppressive Effekt von Tr1-Zellen kann durch Anti-IL-10 Antikörper neutralisiert und verhindert werden, was wiederum zeigt, dass der Supressoreffekt von Tr1-Zellen durch das ausgeschüttete Markerzytokin IL-10 vermittelt wird.

Es wurde postuliert, dass in gesunden und allergischen Individuen die Zelltypen Th1-, Th2- und Tr1-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegen (Akkoc, Akdis et al.; Akdis, Verhagen et al. 2004), und dass eine veränderte Balance der Verhältnisse von Th2- und Tr1-Zellen die Entwicklung von Allergien fördert bzw. vor diesen schützen kann, je nachdem welcher Zelltyp dominiert (Akkoc, Akdis et al.; Akdis, Verhagen et al. 2004).

1.8.2.4 Th3-Zellen

Adaptive Th3-Zellen wurden zum ersten Mal von Chen et al. 1994 als $CD4^+$ -Zellen beschrieben, nachdem diese nach oraler Antigenexposition vermehrt in mesenterialen Lymphknoten entstanden waren und TGF- β , IL-4 und IL-10 in unterschiedlichen Mengen synthetisierten (Chen, Kuchroo et al. 1994). Diese Zellen supprimierten die Entstehung einer experimentell allergischen Enzephalomyelitis und waren deshalb ein früher Hinweis darauf, dass TGF- β und auch IL-10 produzierende Zellen die Entstehung pathogener autoreaktiver T-Zellen inhibieren können (Stock, Rolinck-Werninghaus et al. 2007).

Th3-Zellen sezernieren in hohen Konzentrationen TGF- β , welches eine antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung aufzeigt. Die Th3-Zellen besitzen keinen spezifischen Oberflächenmarker, mit dem sie identifiziert werden könnten, allerdings wurde gezeigt, dass diese Zellen, wie andere Treg-Zellen auch den Transkriptionsfaktor Foxp3 exprimieren können (Beissert, Schwarz et al. 2006). Bisher ist es noch nicht geklärt, ob Tr1 und Th3-Zellen zu der gleichen Subpopulation von adaptiven T-regulatorischen Zellen gehören, da sie einen ähnlichen Phänotyp aufweisen und beide Zellpopulationen ihre supprimierende Wirkung durch die Ausschüttung von IL-10 und TGF- β nutzen.

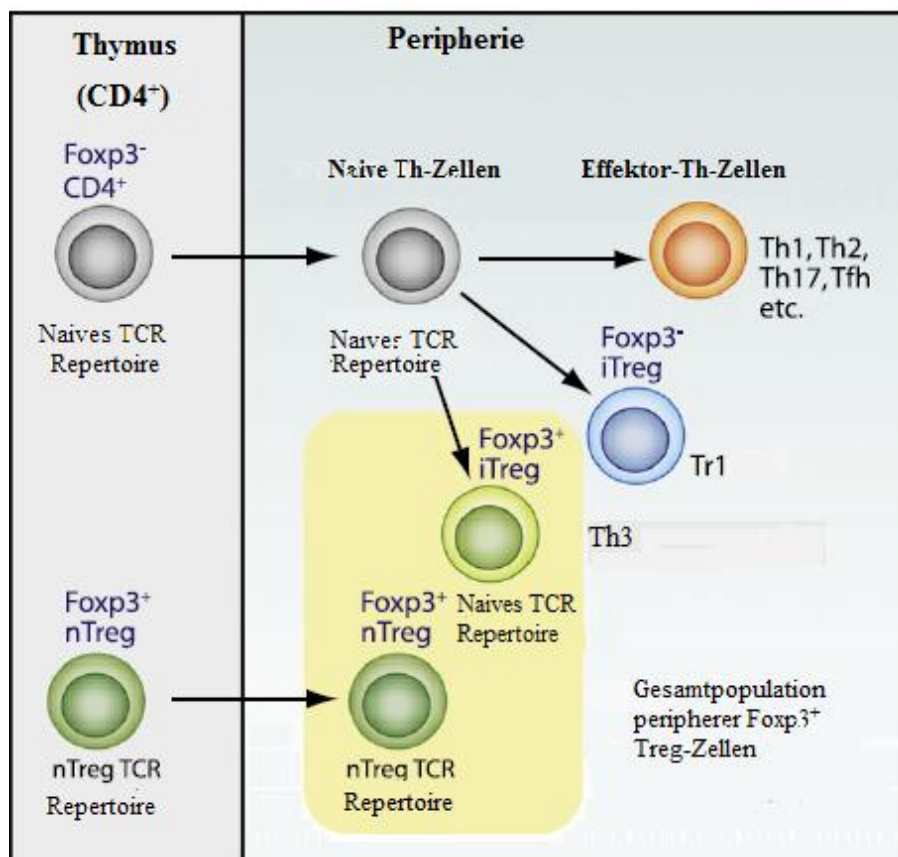


Abb. 4: Differenzierung von regulatorischen T-Zellen im Thymus und in der Peripherie.

Die natürlichen regulatorischen T (nTreg)- Zellen werden im Thymus aktiviert und gelangen anschließend in die Peripherie, wohingegen die Differenzierung von induzierbaren Foxp3⁺Treg-Zellen (iTeg) in den sekundären lymphatischen Organen stattfindet. In der Peripherie können die im Thymus entstandenen Zellen von den in der Peripherie entstandenen Zellen phänotypisch nicht unterschieden werden. Es wird davon ausgegangen, dass sich beide Foxp3⁺-T-reg-Zellpopulationen in ihrem TCR (T cell receptor)-Repertoire voneinander unterscheiden, da iTreg-Zellen das TCR-Repertoire naiver CD4⁺ Zellen aufweisen (Ziegler 2008).

2 Ziele der Arbeit im Kontext der Typ IV-Reaktion

Es existieren bisher nur wenige Daten über das differentielle Vorkommen allergenspezifischer T-Zellpopulationen, die im Rahmen einer allergischen Spättypreaktion auf Arzneimittel, in diesem Fall prototypisch auf Betalactamantibiotika (Penicilline, Cephalosporine), pathophysiologisch bedeutsam sein können. Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher unterschiedliche, allergenspezifische T-Zellpopulationen und deren Markerzytokine im peripheren Blut zu erfassen und genauer zu charakterisieren. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass im peripheren Blut zirkulierende, medikamentenspezifische T-Lymphozyten quantitativ in einem Elispot-Assay nachgewiesen werden können (Rozieres, Hennino et al. 2009). In dieser Studie fanden sich bei Patienten mit einer Amoxicillinallergie vom Spättyp im Vergleich zu entsprechenden Soforttypallergikern deutlich vermehrt Amoxicillin-spezifische IFN- γ -sezernierende T-Zellen im peripheren Blut, was eine wesentliche Rolle dieser Zellen bei der Ausbildung dieser Spättypreaktion nahe legte. Eine andere Studie analysierte bei fünf Patienten mit Spättypallergie auf unterschiedliche Arzneimittel verschiedene zytokinsezernierende, medikamentenspezifische T-Zellen (Beeler and Pichler 2006). Aufgrund der geringeren Anzahl der Patienten und der unterschiedlichen allergieauslösenden Medikamente ließen sich hier keine einheitlichen pathophysiologischen Muster nachweisen. Diese Untersuchung zeigte allerdings, dass arzneimittelspezifische T-Lymphozyten selbst zwölf Jahre nach Auftreten der allergischen Reaktion noch im peripheren Blut nachweisbar sind (Beeler and Pichler 2006).

3 Material

3.1 Patientenmaterial

Vollblut	Patienten der Universitätsklinik für Dermatologie und Allergologie Marburg
----------	----------------------------------------------------------------------------

3.2 Lösungen und Zusätze für die Kultivierung humaner Zellen

Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Humanes Serum (PHS), Typ AB	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
L-Glutamin 200mM mit Penicillin (10.000U/ml)/Streptomycin (10.000µg/ml)	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
RPMI 1640 Medium, ohne L-Glutamin	Lonza, Vervies, Belgien

3.3 Zytokine und Proteinantigene

Interleukin 2, human	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Interleukin 7, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf

3.4 Betalactamantibiotika

Amoxicillin	Hexal, Holzkirchen
Ampicillin	Ratiopharm GmbH, Ulm
Cefixim	Mylan dura GmbH, Darmstadt
Cefuroxim	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Penicillin G	InfectoPharm Arzneimittel, Heppenheim
Penicillin V	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH Frankfurt am Main

3.5 Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC; $C_{14}H_{14}N_2$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Mallinckrodt Baker, Griesheim
Dimethylsulfoxid (DMSO; C_2H_6OS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Dulbecco's PBS 1x (ohne Ca^{2+} Mg^{2+})	PAA Laboratories GMBH, Cölbe
Essigsäure ($C_2H_4O_2$)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA; $C_{10}H_{16}N_2O_8$)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
FACSClean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSFlow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kaliumhydrogencarbonat ($KHCO_3$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Merck KGaA, Darmstadt
N,N Dimethylformamid DMF; C_3H_7NO)	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Pancoll, human	PAN-Biotec GmbH, Aidenbach
Paraformaldehyd (PFA; $(CH_2O)_n$)	Merck KGaA, Darmstadt
2-Propanol (C_3H_8O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Rinderalbumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Tyranblau-Lösung 0,4%	Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Wasserstoffperoxid 30% (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt

3.6 Puffer und Kulturmedien

Puffer/Medium	Zusammensetzung
ACK-Lysis-Puffer	0,15M NH_4Cl + 1mM $KHCO_3$ + 0,1mM EDTA auf 1l ddH ₂ O pH 7,2-7,4 einstellen

Puffer/Medium	Zusammensetzung
FACS-Puffer	Dulbecco's PBS 1x + 1% BSA + 0,1 NaN ₃ Sterile Filtration mittels Stericup 0,22µm (Millipore) Lagerung bei 4°C
Einfriermedium	FCS + 10% DMSO
RPMI ⁺⁺	RPMI 1640 + 100U/ml Penicillin + 100µg/Streptomycin + 2mM L-Glutamin

3.7 Antikörper für durchflusszytomertische Analysen

Spezifität	Isotyp	Konjugat	
CD4	Maus IgG1, k	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD25	Maus IgG1, k	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
CD127	Maus IgG1, k	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

Iso-K	Maus IgG1, k	FITC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	Maus IgG1, k	APC	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Iso-K	Maus IgG1, k	PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

(Iso-K = Isotypkontrolle)

3.8 Kommerzielle Tests für die serologische und zelluläre Diagnostik

BD TM ELISPOT Human IL-5 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD TM ELISPOT Human IL-10 ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
BD TM ELISPOT Human IFN- γ ELISPOT Set	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg

3.9 Verbrauchsmaterialien

24-/48-well (Loch)-Platten, steril	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Combitips 5ml, steril/unsteril	Eppendorf, Hamburg
Deckgläschen für Neubauer Zählkammer, 20 x 26mm	Menzel GmbH & Co.KG, Braunschweig
Einweg-Pipetten 1ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Einfrier- Röhrchen (Cryo's) 2ml, steril	Greiner, Frickenhausen
FACS-Röhrchen (Polystyren-Röhrchen 5ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Millex®-Sterilfilter, Porengröße 0,22µm	Millipore GmbH, Schwalbach
Monovette® (CPDA)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovette® (Serum- Gel)	Sarstedt, Nümbrecht
Pasteurpipetten Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.
Pipettenspitzen	Kalensee, Gießen
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Stericup® 250ml, 500ml Porengröße 0,22µm	Millipore GmbH, Schwalbach
Zentrifugen-Röhrchen 15ml, 50ml	Greiner, Frickenhausen

3.10 Geräte

Analysenwaage 770	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen Frommern
Auflicht-Mikroskop Axiostar	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
CO ₂ -Incubator HERAcell® 150	Heraeus Kendro, Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einfrierbehälter Qualifreeze	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
ELISPOT Scanner Eli.Scan	A.EL.VIS, Hannover
ImmunoCap® 100	Phadia AB, Uppsala, Schweden
inverses Mikroskop Invertoskop ID03	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Kühlzentrifuge Magafuge® 1.0	Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold
Magnetrührer IKAMAG® RET	IKA Labortechnik, Staufen

Mehrkanalpipette Dicovery 20-200µl	ABIMED, Langenfeld
Multipipette® plus	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG Lauda-Königshofen
pH-Meter Cyber Scan pH 510	Eutech Instruments Europe bv, Nijerk, Niederlande
Pipettenhilfe BD Falcon TM Express TM	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pipetten Research® 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage 440-49N	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Balingen- Frommern
Reagenz- Reservoir	Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden
Sterilbank HERAsafe®	Heraeus Kendro Laborator Products GmbH, Langenselbold
Stickstofftank Chronos 200	Cryotherm GmbH & Co.KG, Kirchen
Vortexmixer IKA® Genius 3	IKA Labortechnik, Staufen

3.11 Software

Photoshop® CS2	Adobe
BD Cell Quest™ Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Eli.Analyse ELISPOT Analysis Office Software V4.2	A.EL.VIS, Hannover
Endnote X2	Thomson ResearchSoft,USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, USA
Microsoft® Excel	Microsoft, USA
Microsoft® Word	Microsoft, USA

4 Methoden

4.1 Patienten

Insgesamt wurden 34 Probanden aus der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg in die Antibiotika-Studie eingeschlossen. Die 34 Probanden wurden in vier Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe beinhaltete Patienten mit einer Spättypallergie auf Betalactamantibiotika (Nachweis durch Anamnese und positiven Hauttest; n=8), die zweite Gruppe waren Patienten mit einer Soforttypallergie auf Betalactamantibiotika (Nachweis klinisch oder durch Labordiagnostik; n=5), die dritte Gruppe bestand aus Patienten ohne anamnestische Betalactamantibiotika-Allergie, die aufgrund einer Operation eine prophylaktische Betalactamantibiotikatherapie erhielten (n = 9). Die letzte Gruppe beinhaltete gesunde Kontrollprobanden (n = 12) ohne Betalactamantibiotikaexposition. 17 der 34 Teilnehmer waren Frauen. Das Durchschnittsalter betrug 55 Jahre mit einer Spannweite von 23-90 Jahren. Jeder Proband gab zu Beginn der Studie seine unterschriebene Einverständniserklärung zur Teilnahme an den wissenschaftlichen Untersuchungen ab. Die Studie war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität genehmigt worden. In der folgenden Tabelle sind die Ein- und Ausschlusskriterien für die Studie aufgeführt.

Tab. 2: Ein- und Ausschlusskriterien zur Studienteilnahme

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Allergie vom Soforttyp oder Spättyp auf Betalactamantibiotika mit entsprechender positiver Anamnese	Kontraindikationen gegen die Gabe von Betalactamantibiotika
Nachweis einer Sensibilisierung gegen Betalactamantibiotika im Prick-, Intracutan-, oder Epikutantest	Minderjährige und nicht einwilligungsfähige Patienten
serologischer Nachweis Betalactamantibiotika-spezifischer IgE-Antikörper	

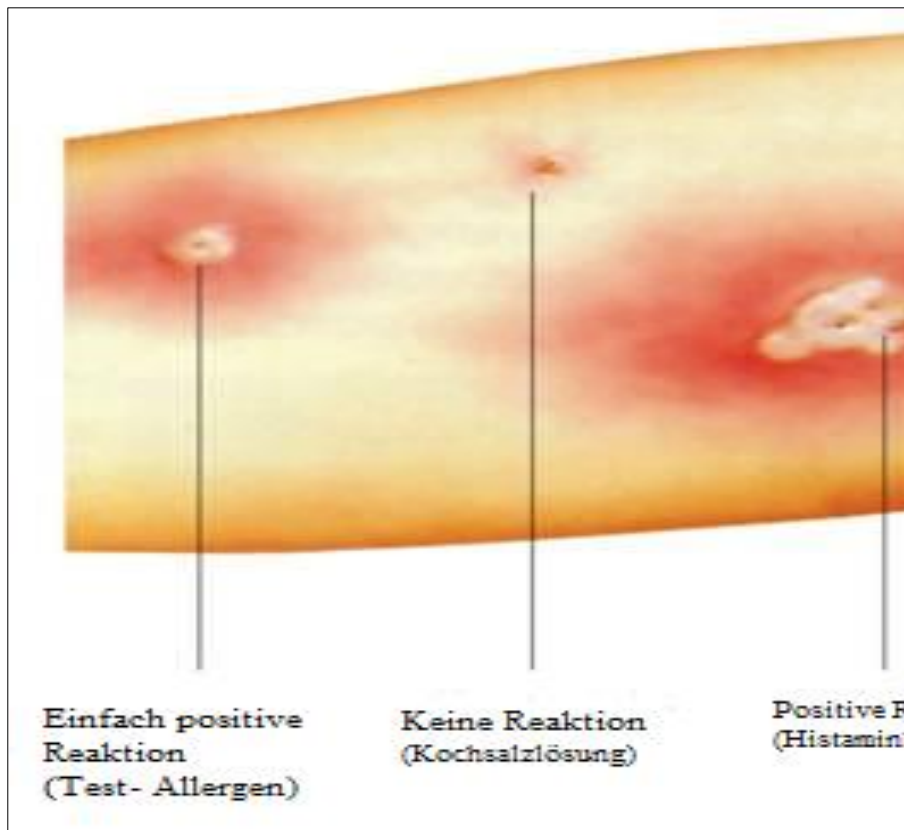
4.2 Klinische Evaluationen

Die klinische Bewertung, d.h. die Erfassung der jeweiligen Anamnese der Testpersonen, die Durchführung der kutan-vaskulären Testungen und die orale Provokation auf Station zu Beginn der Studie, führten ärztliche und technische Mitarbeiter der Allergieambulanz der Klinik für Dermatologie und Allergologie der Philipps-Universität Marburg durch.

4.2.1 Pricktest

Der Pricktest dient zum objektiven Nachweis einer IgE-vermittelten Soforttypallergie gegen Betalactamantibiotika. Das Prinzip des Tests besteht darin, das Allergen in die Dermis zu bringen und auf den dort liegenden Mastzellen oberflächlich gebundenen spezifischen IgE-Antikörpern in Kontakt zu bringen. Kommt es zu einer Aktivierung von Mastzellen durch die Quervernetzung der spezifischen IgE-Antikörper, führt dies zu einer Freisetzung von Mediatoren aus der Zelle. Die im Wesentlichen durch Histamin ausgelöste Testreaktion zeigt sich in Form einer Quaddel und Rötung.

Der Test wurde an der Volarseite des Unterarms der jeweiligen Testpersonen durchgeführt. Hierbei wurde 5-10 µl eines Betalactamantibiotikas (Benzylpenicillin, 1 Mio IE (300 mg/ml);, Phenoxyethylpenicillin, 1,2 Mega gelöst in 5ml 0,9% NaCl-Lösung (137 mg/ml); Amoxicillin, 100mg/ml; Ampicillin, 100 mg/ml; Cefuroxim, 50mg/ml; Cefixim, 200 mg gelöst in 5 ml 0,9% NaCl-Lösung (40mg/ml)) auf die Haut getropft und anschließend mit einer Pricklanzette bei einem Stich in die Haut durchstoßen, sodass die jeweiligen Substanzen in die Epidermis eindringen konnten; gleichzeitig musste darauf geachtet werden, dass es hierbei nicht zu einem Blutaustritt kommt. Im Vergleich wurden immer zwei Kontrolltestungen durchgeführt, eine Positivkontrolle mit Histaminhydrochloridlösung (0,1%) und eine Negativkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung. Dadurch kann die Hautreaktion auf das jeweilige Betalactamantibiotikum besser beurteilt und interpretiert werden. Die Ablesung der Hautreaktion erfolgte nach 20 Minuten, hierbei wurde auf die jeweilige Größe und auf den Durchmesser von Quaddel (Urtikaria) und Erythem (Rötung) geachtet und diese mit der Positivkontrolle verglichen. Als positives Testergebnis galt ein mittlerer Quaddeldurchmesser von >3mm. Das Ausmaß der Quaddelbildung wurde in Relation zur Histamin-induzierten Quaddel bewertet. Beim einfach positiven (+) Ergebnis war die Quaddel kleiner als, beim zweifach positiven (++) identisch groß wie und beim dreifach positiven (+++) größer als die Quaddel in der Positivkontrolle. Wenn das Ergebnis vierfach positiv (+++++) war, so zeigten sich zusätzlich Ausläufer (Pseudopodien).



(asthma-aspekte.medizin-aspekte.de)

Abb. 5: Schematische Darstellung eines Prick-Tests. Die oben dargestellte Abbildung zeigt ein Testergebnis des Prick-Tests am volaren Unterarm. Das Test-Allergen ruft eine einfach positive Reaktion hervor (links im Bild), die folgende Kriterien erfüllt: Erythem (Rötung), Quaddel (Urtika) größer als 3mm, aber kleiner als die Positivkontrolle mit 0,1% Histaminhydrochloridlösung (rechts im Bild). In der Mitte findet sich die Negativkontrolle (physiologische Kochsalzlösung).

4.2.2 Intrakutantest

Der Intrakutantest wurde ebenfalls an der Volarseite des Unterarms durchgeführt. Hierbei wurde zur Vermeidung unspezifischer Irritationen eine 100fach mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnte Menge der unter 4.1.1. aufgeführten Konzentrationen der parenteralen Antibiotikallösungen Benzylpenicillin, Amoxicillin, Ampicillin und Cefuroxim in eine sterile Tuberkulinspritze aufgezogen und mit einer Kanüle intradermal injiziert. Mit jedem injizierten Volumen wurde eine Quaddel von ca. 3mm Durchmesser gesetzt. Für jedes unterschiedliche Betalactamantibiotikum wurde eine neue Spritze mit Kanüle verwendet, sodass es beim Zurücklaufen der Flüssigkeit nicht zur Kontaminationen kommen konnte. Bei der Durchführung des Tests wurde eine Negativkontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung mitgeführt. Die Ablesung der Testergebnisse erfolgte nach 20 Minuten. Der Grad der positiven Reaktion wurde anhand des Vergleichs mit der injektionsbedingten Quaddel bestimmt, wobei eine Zunahme des Quaddeldurchmessers von mind. 3 mm als positiv beurteilt wurde.

4.2.3 Epikutantest

Vor der Durchführung des Epikutantests wurde bei jeder einzelnen Testperson darauf geachtet, dass die zu testende Hautpartie keinen pathologischen Befund aufzeigte. Des Weiteren mussten die Testpersonen darüber aufgeklärt werden, dass sie während der Testung weder Baden noch Duschen bzw. auf körperlich anstrengende Aktivitäten verzichten sollten, um das Ablösen des Epikutanpflasters zu vermeiden.

Der Epikutantest wurde am oberen Rücken ca. 2-4cm beidseits der Wirbelsäule angewandt. Der obere Rücken wurde für die Testung ausgewählt, da die Reaktionsbereitschaft dort am stärksten ist und diese von kranial nach kaudal abnimmt. Allgemein wurde zu Beginn des Tests bei jedem Patienten die betroffene Stelle mit verdünntem Alkohol gereinigt und die Haut somit von Unreinheiten beseitigt. Bei trockener Haut werden dadurch zudem nicht haftende Hornzellen entfernt. Danach wurden entsprechend der Empfehlungen von Brockow (Brockow, Romano et al. 2002) die zur Pricktestung verwendeten Betalactamantibiotikallösungen (siehe 4.2.1) in die leeren Testkammerchen des Epikutanpflasters gegeben und auf den Rücken aufgeklebt. Durch die Pflaster blieben die zu testenden Substanzen an der vorgesehenen Stelle und konnten dadurch in die Haut einwirken. Nach 48 Stunden wurde das Pflaster entfernt. Danach wurden die betroffenen Hautpartien mit einem Stift markiert. Die Ablesungen erfolgten 48h und 72h.

Grundlage der Beurteilung des Epikutantests ist die Morphe der im Testfeld induzierten Hautveränderung. Entsprechend der Vorgaben der Deutschen Kontaktallergiegruppe wurden die Teststellen am Rücken zum Zeitpunkt von 48h und 72h mit einem „+“ gewertet, die ein Erythem, Infiltrat oder diskrete Papeln aufzeigten, mit „++“, die zusätzlich noch Vesikel aufwiesen, mit „+++“, falls konfluierende Vesikel an der betroffenen Stelle sichtbar waren. Jedes dieser Symbole wurde als allergische Reaktion gewertet. Follikuläre Reaktionen (follikulär gebundene Papeln) wurden in die Bewertung mit dem Symbol „f“ eingeordnet. War nur ein Erythem sichtbar, aber kein Infiltrat, wurde die Reaktion mit einem Fragezeichen bewertet. Irritative Reaktionen („ir“) zeigten einen sogenannten Seifen- oder Ringeffekt, eine Blase oder auch Nekrose konnte zudem sichtbar sein. Wenn keine Veränderungen an den getesteten Hautpartien zu sehen waren, so wurde die Reaktion als negativ bewertet.

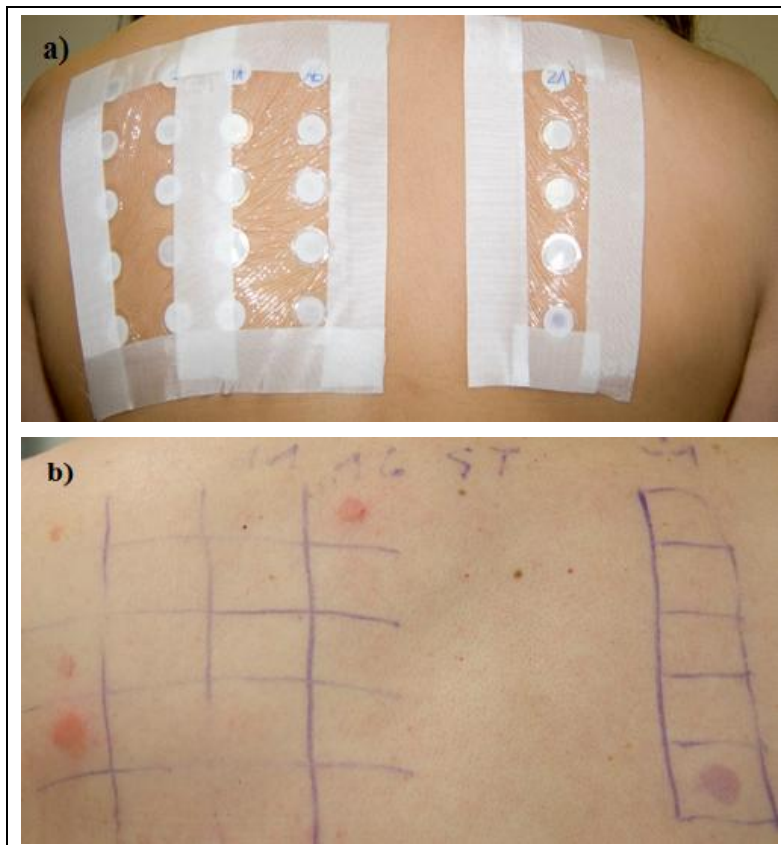


Abb. 6: Durchführung eines Epikutantests mittels „Finn Chamber.“ Die oben aufgeführten Abbildungen (a und b) zeigen die Durchführung und das Ergebnis eines Epikutantests nach Saal-Hellwig. Das auslösende Allergen wird hierbei in geringer Konzentration in kleinen Testkammern aus Aluminium, so genannten „Finn Chambers“, gegeben und in der Regel rechts und links der Wirbelsäule am Rücken auf die Haut geklebt. Die vorbereiteten Testpflaster werden dann nach 48 bzw. 72 Stunden abgelesen (Meves 2006). In b) zeigen sich entsprechende Sensibilisierungen und somit positive Testergebnisse. Unter den Kammern lassen sich je nach Reaktion Rötungen (Erytheme) mit Bläschen oder Papeln erkennen (Uter, Hegewald et al. 2005).

4.2.4 Orale Provokationstestung

Die OPT wurde bei dem Teil der Patienten mit Verdacht auf Betalactamantibiotikaallergie durchgeführt, bei denen sich durch Haut- oder Labortests keine Sofort- oder Spättypallergie diagnostizieren ließen. Für die Durchführung wurden die Patienten in einer symptomfreien, klinisch stabilen Phase stationär aufgenommen. Bei Patienten mit schwerer klinischer Symptomatik in der Anamnese (z.B. anaphylaktischer Schock, Arzneiexanthem mit innerer Organbeteiligung, schwere blasenbildende Arzneireaktion) wurde von einer OPT abgesehen.

Die OPT erfolgte als doppelblind placebokontrollierte Gabe mit steigender Konzentration des jeweiligen Betalactamantibioticums. Im Rahmen der Testungen wurde das Antibiotikum in unterschiedlicher Wirkstoffmenge (Tabelle 4) oral verabreicht und bis zu einer bestimmten Einmaldosis und einer kumulativen Gesamtdosis in 90-minütigen Abständen verabreicht.

Nach der Einnahme des Antibiotikums wurde in unterschiedlichen Zeitabständen (nach 30, 60, und 90 Minuten), die Vitalparameter gemessen und der Patient wurde nach seinem Allgemeinbefinden befragt. Je nach Hauterscheinungen und objektiver Allgemeinsymptomatik wurde der Patient behandelt und die Ergebnisse schriftlich dokumentiert.

4.3 Zelluläre Diagnostik

4.3.1 Messung des spezifischen und Gesamt-IgE auf Betalactamantibiotikum

Mittels kommerziellen Phadia ImmunoCap System wurden die Gesamtmengen der zirkulierenden IgE-Antikörper (Gesamt-IgE) sowie die Penicillin G, Penicillin V, Ampicillin und Amoxicillin-spezifischen IgE-Konzentrationen bei jedem Patient im Serum bestimmt. Das Messprinzip beruht auf einem Fluoro-Enzym-Immuno-Assay (FEIA), hierbei binden die menschlichen IgE-Antikörper kovalent an das ImmunoCap. Nachdem die Serumproben in die ImmunoCaps gegeben und diese mit enzym-markierten anti-IgE inkubiert wurden, konnte mit einer Enzym-Substrat-Reaktion die Fluoreszenzintensität mit einem entsprechenden Messgerät detektiert werden.

4.3.2 Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Für die In-vitro-Untersuchungen wurde den Patienten peripheres Vollblut in einem mit Antikoagulantien versetzten CPDA (Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin) Röhrchen entnommen. Anschließend erfolgte die Isolierung der PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) mittels Dichtegradienten-Zentrifugation. Das für die Trennlösung eingesetzte Pancoll ist ein hydrophiles Zuckerpolymer, welches eine Dichte von 1,077g/ml besitzt. Während der Zentrifugation des CPDA-Blutes kam es zu einer Aggregation von Erythrozyten und Granulozyten. Erythrozyten haben eine erhöhte Dichte und lagern sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ab. Darüber kommt es zur Aggregation der Granulozyten. Die übrigen Zellen, bestehend aus Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten besitzen die niedrigste Dichte und bilden daher eine konzentrierte Grenzschicht zwischen der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) und dem Pancoll.

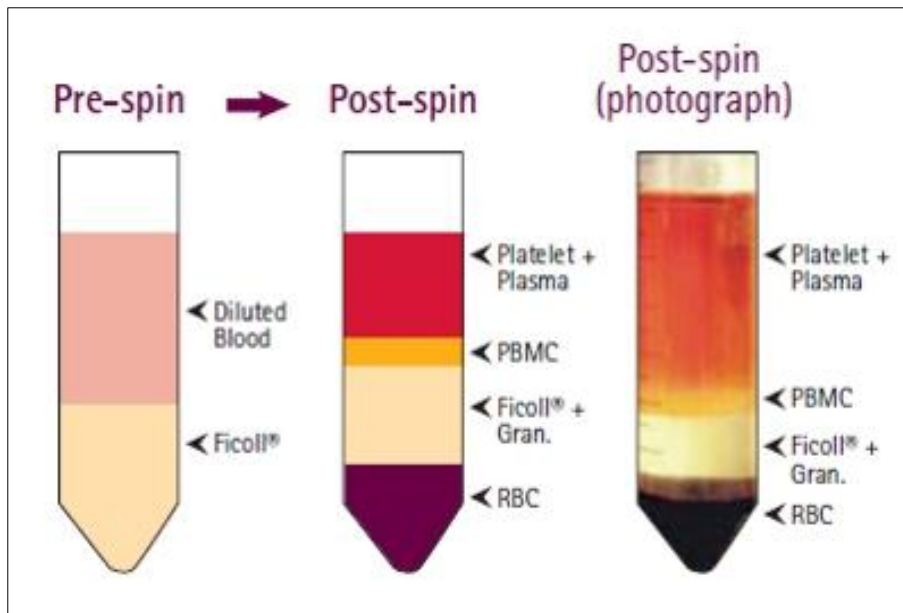


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Zellseparation mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (modifiziert nach BIOCOMPARE): Pre-Spin = vor Zentrifugation: die obere Schicht stellt das verdünnte Blut dar, das auf Ficoll geschichtet wird. Post-Spin = nach Zentrifugation: die oberste Schicht mit der geringsten Dichte besteht aus Plasma und Thrombozyten, danach kommt die Schicht mit den *PBMC* (*peripheral blood mononuclear cells*), darunter die Trennlösung (Ficoll) und Granulozyten (Gran). Die unterste Schicht mit der höchsten Dichte sind die Erythrozyten, die sich nach Aggregation am Boden ablagern.

Durchführung:

Das Vollblut der Patienten in den CPDA-Röhrchen wurde zu Beginn bei 1.300rpm (4°C; 10min) zentrifugiert, um das Blutplasma von den zellulären Blutbestandteilen zu entfernen. Danach wurde das abgesetzte Blutplasma abpipettiert und in Cyro-Tubes bei -20°C eingefroren. Die zellulären Blutbestandteile wurden dann in einem Verhältnis von 1:2 mit PBS verdünnt. Im Anschluss wurde das zelluläre Blut/Plasma-Gemisch vorsichtig auf das in den Falcon-Röhrchen vorgelegte Pancoll geschichtet und bei 1500rpm (20°C; 30min) zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren entstand die (PBMC)-Grenzschicht zwischen PBS und Ficoll. Diese wurde abpipettiert und in ein neues Falconröhrchen überführt, mit PBS aufgefüllt und erneut bei 1800rpm (4°C; 10min) zentrifugiert. Es folgte im Anschluss ein erneuter Waschschriff mit Zentrifugation (1300rpm; 4°C; 10min), wobei der Überstand immer dekantiert und verworfen wurde. Im letzten Schritt wurde das vorhandene PBMC-Pellet in RPMI⁺⁺ resuspendiert. Eine Zellprobe wurde mittels 0,4% Trypanblau-Lösung in einem Verhältnis 1:1 verdünnt und anschließend die Lebendzellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Durch den Trypanblau-Farbstoff wurden die lebenden Zellen von den toten Zellen unterschieden. Der Farbstoff konnte die Membran vitaler Zellen nicht passieren, wodurch die Lebendzellen farblos unter dem Lichtmikroskop erscheinen. Die toten Zellen zeigten hingegen eine dunkelblaue

Anfärbung aufgrund des Farbstoffdurchtritts und der selektiven Anfärbung zytosolischer Proteine. Zur Berechnung der Lebendzellzahlen wurden dann vier Großquadrate der Neubauer-Zählkammer ausgewertet (Fläche: 1mm^2 , Tiefe: $0,1\text{mm}$ und Volumen: $0,1\mu\text{l}$) und anschließend die Zahl lebender Zellen innerhalb der Zellsuspension mittels der nachfolgenden Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Summe der gezählten Zellen} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} (=2) \times 10^4$$

4.3.3 Kryokonservierung und Auftauen der PBMC

Für die Kryokonservierung mussten die in RPMI^{++} aufgenommenen Zellen erneut abzentrifugiert werden ($1300\text{ rpm } 4^\circ\text{C}; 10\text{min}$). Nachdem der Überstand verworfen wurde konnte das Zellpellet in Einfriermedium (FCS mit 10% DMSO) resuspendiert werden. Hierbei wurde von einer Zelldichte zwischen $5\text{-}10 \times 10^6$ PBMC/ml ausgegangen und in die Einfrieröhrchen überführt. In einem mit 2-Propanol befüllten Einfrierbehälter (Temperaturabnahme 1°C/min) wurden die Zellen auf -80°C heruntergekühlt, um anschließend in flüssigen Stickstoff bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt zu werden.

4.3.4 Durchflusszytometrie

Die Grundlage der Durchflusszytometrie oder auch FACS-Analyse (für *Fluorescence activated cell sorting*) ist die quantitative Bestimmung von Größe, Granularität, Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen in Einzelsuspensionen zur phänotypischen Charakterisierung von Lymphozyten. Die mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern beschichteten Einzellzellsuspensionen passieren Lichtstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge (von 488 bzw. 635nm). Es wird zum einen die Lichtstreuung, zum anderen das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorochrome erfasst. Die Zellen streuen einen Teil des Lichts, welches mittels Photomultiplier (Detektoren) nachgewiesen wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe, Volumen und dem jeweiligen Aufbau der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter*) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur ihres Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Gleichzeitig mit dem gestreuten Licht werden im Durchflusszytometer die farbstoffgekoppelten Antikörper und deren unterschiedliche Fluoreszenzintensität gemessen, die in den entsprechenden Fluoreszenzkanälen detektiert werden. Die zeitgleiche Erfassung von bis zu vier Farbstoffen kann durch das Einsetzen von zwei Ionenlaser gewährleistet

werden, die Fluoreszenzmoleküle von unterschiedlich markierten Zellen anregen. Hierzu zählen der Argon-Ionenlaser, der Fluorescein-Isothiocyant (FITC) und Phycoerythrin (PE) erfasst, und der Diodenlaser, der Allophycocyanin (APC) stimuliert. Anhand der Bestimmung der Expression unterschiedlicher CD-Antigene, die auf der Zelloberfläche der einzelnen Lymphozytenpopulationen vorhanden sind, werden die einzelnen lymphozytischen Subgruppen differenziert, charakterisiert und somit ihr Immunphänotyp bestimmt.

Durchführung:

Zu Beginn der Messung wurde das Patientenvollblut mit Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat (ACK) Lysis-Puffer im Verhältnis 1:10 für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 1200rpm (4°C; 8min) zentrifugiert. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um vorhandene Erythrozyten, die das Streulicht der Lymphozyten überlagern, durch einen Flüssigkeitsinflux zum Platzen zu bringen und somit zu beseitigen. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde erneut mit ACK-Lysis-Puffer aufgefüllt und für 5 min inkubiert, es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit den gleichen Einstellungen. Im Anschluss wurden die Zellen in RPMI⁺⁺-Medium gewaschen und in FACS-Puffer für die nachfolgende durchflusszytometrische Untersuchungen resuspendiert.

4.3.5 Frequenzanalyse von CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatorischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Phänotypbestimmung CD4⁺CD25⁺CD127^{low} anhand der Oberflächenmarker von Treg-Zellen und deren Frequenz wurden mittels Durchflusszytometrie direkt nach Entnahme des Patientenblutes durchgeführt. Hierfür wurden wie in Kap. 4.3.2 beschrieben die Erythrozyten durch ACK-Lysis aus dem CPDA-Blut entfernt und anschließend die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen. Jeweils 1x10⁶ Zellen wurden in 1ml FACS-Puffer aufgenommen und dann bei 1600rpm (4°C; 5min) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die farbstoffgekoppelten Antikörper bzw. die Isotypkontrollen (nach Herstellerangaben) zu den Zellen hinzugefügt und resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 20 min auf Eis im Dunkeln. Danach wurden die Zellen zweimal mit je 1ml FACS-Puffer gewaschen (1600rpm; 4°C; 5min) und für die durchflusszytometrische Messung in einem Volumen von 250µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Bestimmung der Lymphozytenpopulation, basierend auf der Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker, wurde mit Hilfe des FACS-CaliburTM-Durchflusszytometer und der dazugehörig entsprechenden CellQuestTM Software durchgeführt.

4.3.6 Frequenzanalyse antigenspezifischer T-Zellen durch das *enzyme-linked immunospot* (ELISPOT)-Verfahren

Seit 1983 wird das Prinzip des ELISPOT-Assay genutzt. Er ist einer der sensitivsten Methoden, um antigenspezifische T-Zellen auf Einzelzellebene anhand der Sekretion von Effektormolekülen (Zytokinen) zu quantifizieren (Czerkinsky, Nilsson et al. 1983). Er basiert auf dem Verfahren des ELISA, hat aber im Vergleich eine höhere Sensitivität und Spezifität, da er nicht die Gesamtkonzentration des Zytokins bestimmt, sondern einzelne stimulierte antigenspezifische Immunzellen anhand ihrer Zytokinsekretion nachweist. Der ELISPOT stellt eine zuverlässige und reproduzierbare Methode zum Nachweis ausgewählter zytokinproduzierender T-Zellpopulationen dar (Gabrielsson, Soderlund et al. 2001; Mashishi and Gray 2002; Lindemann, Bohmer et al. 2003).

Auf einer mit monoklonalen *capture*-Antikörpern beschichteten, hydrophoben Immobilisation-P (Polyvinylidenfluorid; PVDF) Membran in einer 96-well-MultiScreen-Platte kommt es nach Zugabe der Zellsuspension innerhalb der Sekretionsphase (zwischen 2-24h) zur Freisetzung der Zytokine von antigenspezifischen T-Zellen. Die monoklonalen *capture*-Antikörper binden die von den Zellen ausgeschütteten Zytokine. Im Anschluss werden die Zellen durch mehrere Waschvorgänge entfernt. Ein biotinylierter Detektionsantikörper und ein nachfolgend zugegebenes enzymgekoppeltes Konjugat gehen eine Wechselwirkung ein. Durch das anschließende Hinzufügen eines chromogenen Substrates tritt eine kolorimetrische Reaktion ein, die das gebundene Zytokin als farbigen Punkt (*Spot*) sichtbar macht. Durch ein computergesteuertes Analysesystem können die einzelnen *Spots* quantifiziert werden. Die Frequenz der detektierten *Spots* nach Antigenstimulation korreliert folglich mit der Zahl zytokinsezernierender Zellen.

4.3.7 Frequenzanalyse von Betalactam-spezifischen T-Zellen durch das ELISPOT-Verfahren bei Allergikern und gesunden Kontrollen

Durchführung:

1. Tag) Zellaufbereitung:

Zu Beginn wurden die kryokonservierten PBMC im Wasserbad aufgetaut und in einer Konzentration von 1×10^6 PBMC/ml in Kulturmedium (RPMI⁺⁺ + 10% PHS) auf eine 24-well-Platte pipettiert. Es folgte die Primärstimulation der Zellen mit den jeweiligen Antibiotikum: 200µg/ml Penicillin, 200µg/ml Amoxicillin, 50µg/ml Cefuroxim. Eine unstimulierte Kontrolle, d.h. ohne Zugabe eines Antigens diente als Negativkontrolle.

3. Tag) Expansion antigenspezifischer Zellen durch Wachstumsfaktoren:

Nach 48h Inkubation bei 37°C wurden den Zellen die Wachstumsfaktoren IL-2 (10U/ml) und IL-7 (10ng/ml) zugefügt, um eine Expansion antigenspezifischer T-Zellen zu erreichen.

7. Tag) Zugabe der plattengebundenen Antikörper:

Nach weiteren fünf Tagen folgte die Zugabe der monoklonalen *capture*-Antikörpern anti-human IFN- γ , anti-human IL-5 und anti-human IL-10 (5 μ g/ml Endkonzentration) auf die Membran und eine Inkubation über Nacht bei 4°C.

8. Tag) Blockieren der ELISPOT-Membran und Restimulation der Zellen:

Am nächsten Tag wurden die Platten mit RPMI⁺⁺ + 10% FCS blockiert. Die Aufbereitung der Zellen erfolgte durch Resuspension in RPMI⁺⁺ und anschließendem Zentrifugationsschritt bei 1200rpm (4°C; 8min). Es folgte die Aufnahme der Zellen in RPMI⁺⁺ + 10% PHS (1x10⁶/ml) und danach die Restimulation mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Antibiotika (200 μ g/ml Penicillin und 200 μ g/ml Amoxicillin, 50 μ g/ml Cefuroxim) sowie einer Positivkontrolle (1% PHA) der Zellen. Pro *well* wurden 100 μ l RPMI⁺⁺ + 10% PHS inklusive der entsprechenden Antibiotika vorgelegt und anschließend die (2x10⁵ Zellen/100 μ l) hinzugefügt. Anschließend erfolgt eine Inkubationsphase für 20h bei 37°C und 5% CO₂.

9. Tag) Detektion:

Zum Schluss wurde der sekundäre Detektionsantikörper, das Enzymkonjugat Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*) und das AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)-Substratreagenz nach Anweisungen des Herstellers (BD Biosciences) hinzugefügt. Daraufhin wurde das gebundene Zytokin mittels kolorimetrischer Reaktion sichtbar gemacht. Es kam zur Entwicklung der *Spots*.

10. Tag) Auswertung

Nach einer Trocknungsphase der Membran über Nacht konnten die *Spots* mittels eines ELISPOT-Lesegeräts (Eli.Scan F-3200) und der dazugehörigen Software Eli.Analyse V4.2 erfasst und ausgewertet werden. Die Frequenz der jeweiligen Betalactamantibiotikaspezifischen Zellen ergab sich aus dem Median der in Triplikaten bestimmten Proben. Hierfür wurde die Anzahl der *Spots* in der unstimulierten Probe von der *Spot*-Anzahl des antibiotikastimulierten Ansatzes subtrahiert.

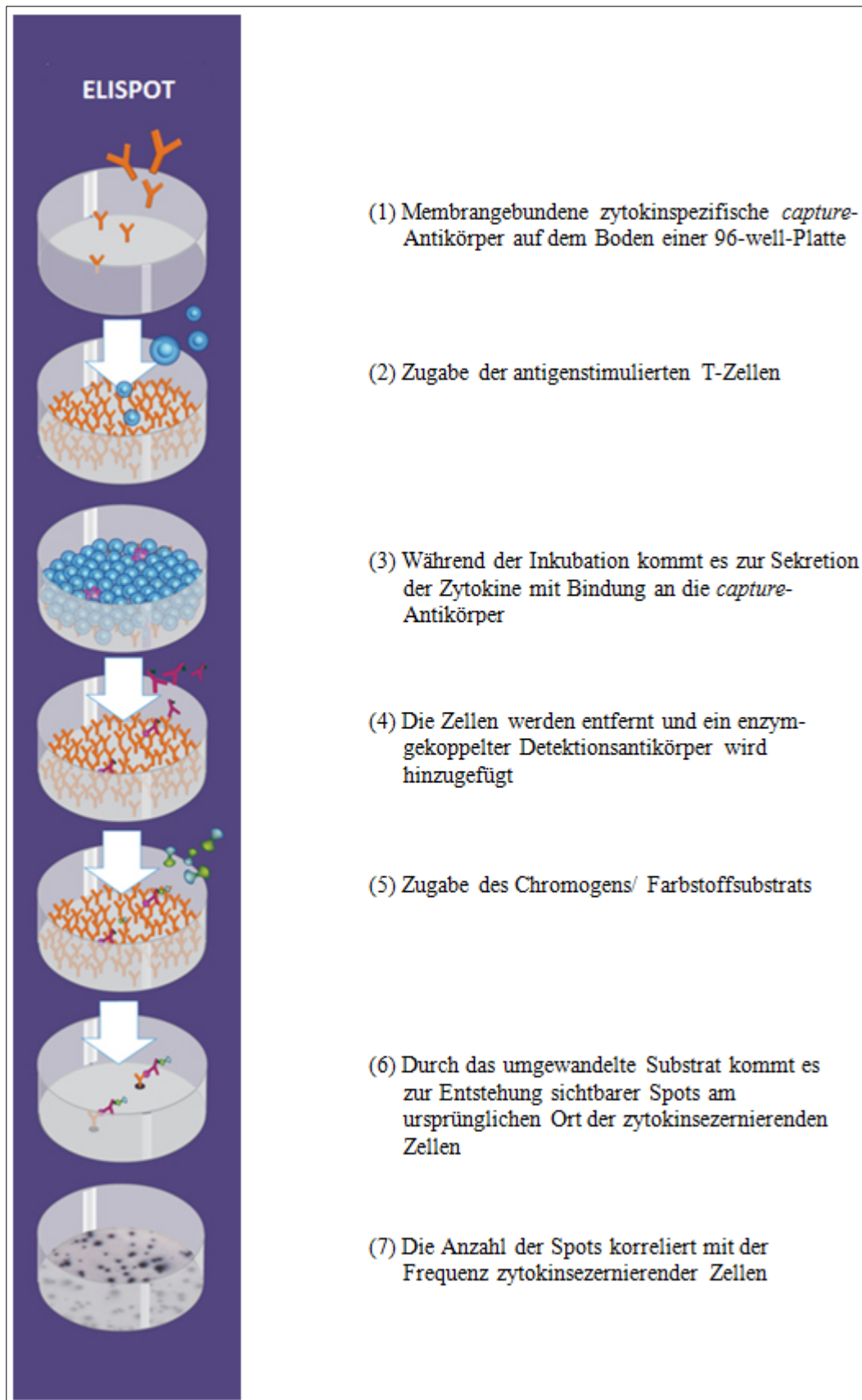


Abb. 8: Schematische Darstellung eines ELISPOT Assays (modifiziert nach MABTECH)

5 Ergebnisse

5.1 Resultate der allergologischen Testungen mit Betalactamantibiotika

Die Studie umfasste 4 Probandengruppen, deren T-zelluläre Reaktivitäten auf Betalactamantibiotika (Penicillin G, Amoxicillin, Ampicillin, Cefuroxim) evaluiert werden sollten. Es waren Patienten mit einer Soforttyp- oder Spättypallergie auf ein Betalactamantibiotikum sowie 2 Kontrollgruppen, bei denen anamnestisch keine Betalactamantibiotikaallergie bestand. Von den initial inkludierten 48 Probanden wurden nach vergleichender Evaluation der Anamnese, allergologischer Untersuchungsergebnisse und Routinelaborparameter (IgE-Diagnostik) 14 für die T-Zelldiagnostik ausgeschlossen. Dies betraf ausschließlich Probanden mit ursprünglichem Verdacht auf eine Spättypallergie auf ein Betalactamantibiotikum (Abb. 9). Die nicht-allergischen Kontrollgruppen umfassten Probanden, die einem Betalactamantibiotikum zum Zeitpunkt der T-zellulären Diagnostik exponiert waren (in diesem Fall Patienten, die eine Antibiotikaprophylaxe im Rahmen einer operativen Basaliomentfernung erhielten) und unbehandelte, gesunde Kontrollpersonen.

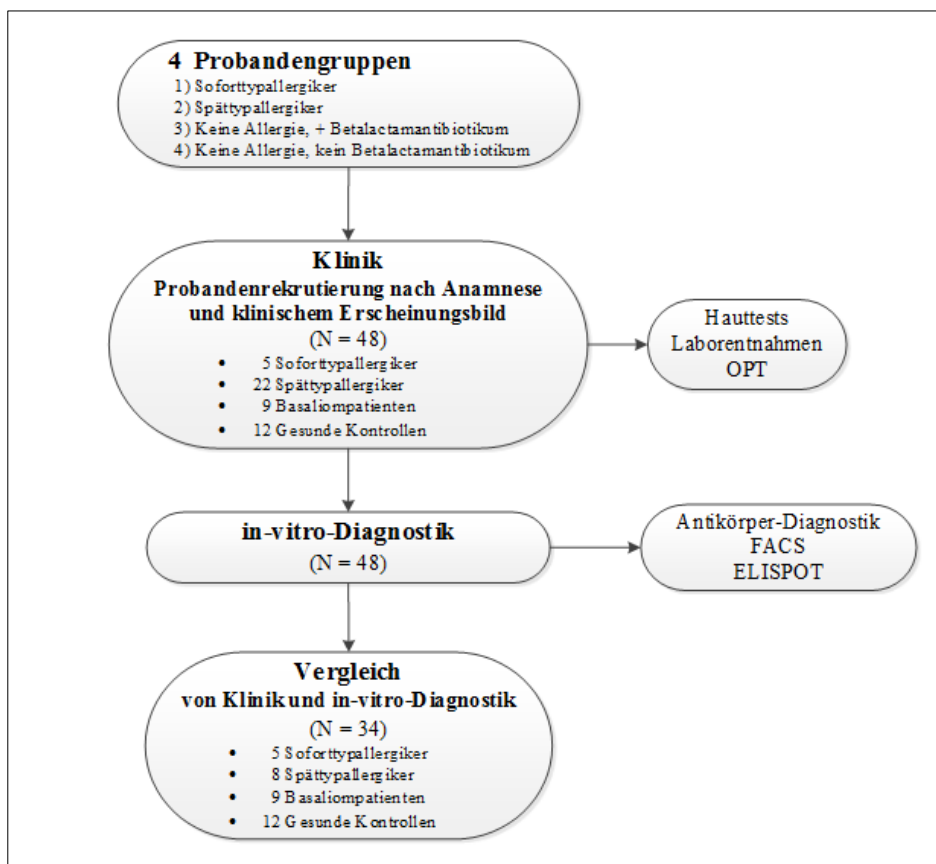


Abb. 9: Durchführung der Studie mittels Flussdiagramm. Zu Beginn wurden vier Probandengruppen festgelegt, die alle mit den Spättypallergikern verglichen werden sollten. Auf Grundlage der Anamnese so-

wie des klinischen Erscheinungsbildes wurden insgesamt 48 Probanden für die Studie rekrutiert. Nach Durchführung von Hauttests, Laborentnahmen und z.T. OPT wurde mit der in-vitro-Diagnostik begonnen. Hier wurden Gesamt- und spezifische IgE-Antikörper, T-Zellfrequenzen, FACS-Analyse und ELISPOT-Assays bestimmt. Im Anschluss wurden die klinischen Daten mit den Ergebnissen der in-vitro Experimente verglichen und ermittelt. Von den ursprünglich 48 Patienten konnten letztlich nur 34 Probanden ausgewertet werden. Es kam zu Drop-outs da klinische Erscheinungsbilder während der ursprünglichen allergischen Reaktion nicht mehr nachvollziehbar waren oder die Laborbefunde keine eindeutige Zuordnung erlaubten.

Tab. 3: Patientencharakteristik der jeweiligen Probandengruppen

Probanden- gruppen	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Anzahl	n = 5	n = 8	n = 9	n = 12
Geschlecht (weib- lich/männlich)	5/0	2/6	3/6	7/5
Alter (in Jah- ren) ^a	50,2	57,5	72,1	39,0
Spannweite des Alters (in Jah- ren)	24-66	40-80	56-90	26-72
Gesamt-IgE (kUA/l) ^b	52,1	23,7	59,2	71,05
Spannweite des Gesamt-IgE (kUA/l)	5,61-163	7,35-212	3,5-827	7,55-395

^a Mittelwert

^b Daten sind als Median dargestellt

Bei acht von den insgesamt acht Spättypallergikern hatte sich die Allergie als makulopapulöses Exanthem manifestiert (Abb.10). Ein Patient war anamnestisch als AGEF beschrieben, wurde aber nicht in die Spättypgruppe einbezogen (Abb.11 zeigt die Reaktion des AGEF-Patienten im Epikutantest).



Abb. 10: Rückbildung eines klassisch makulopapulöses Exanthems am Rumpf nach Einnahme eines Penicillinpräparats.

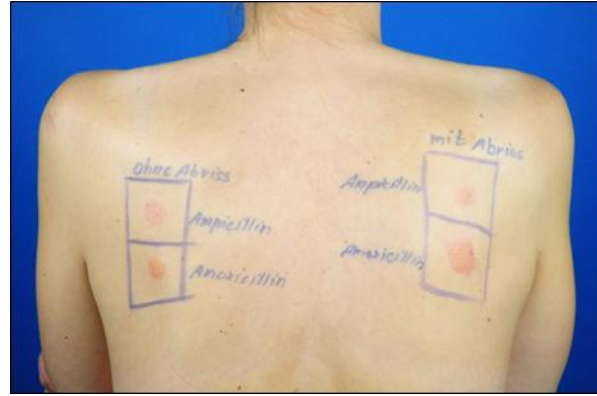


Abb. 11: Deutliche Spättypreaktion im Epikutantest. Am linken Schulterblatt - ohne Tesafimabriss - zeigte sich nach 6h ein Erythem mit Vesikeln (++) auf Ampicillin. Die Reaktion auf Amoxicillin ist verstärkt und deutlich konfluierende Vesikel (+++) sind sichtbar. Am rechten Schulterblatt wurde der Test mit Tesafilmabriss durchgeführt, hier konnten die gleichen Reaktionen nach 72h festgestellt werden.

Bei fünf Soforttypallergikern kam es in der Anamnese zu einer Urtikaria. Hiervon wiesen zwei zusätzlich noch ein Quinke-Ödem auf. Drei der fünf Soforttypallergiker hatten neben der klassischen Erscheinungsform noch eine systemische Reaktion. Die Patienten klagten über Kopfschmerzen, Übelkeit oder Kreislaufsymptomatik mit teilweise auftretender Benommenheit bis hin zur Bewusstlosigkeit.

Zwei Spättypallergiker sowie fünf Soforttypallergiker stimmten einer OPT mit dem jeweiligen Betalactamantibiotikum zu. Die zwei Spättypallergiker wurden bei der OPT auf ein Ausweichantibiotikum getestet, welches gut vertragen wurde. Bei den Soforttypallergikern beendeten zwei den OPT vorläufig aufgrund eines Exanthems bzw. wegen Unwohlsein auf das jeweilige Antibiotikum. Ein Soforttypallergiker wurde wegen Kontraindikationen (eindeutige Anamnese, ausgeprägte allergische Reaktionen auf Amoxicillin im Prick- und Intrakutantest) von der OPT ausgeschlossen. Die Abbildung 12 zeigt die Reaktion der Patientin nach 20 Minuten im Intrakutantest.

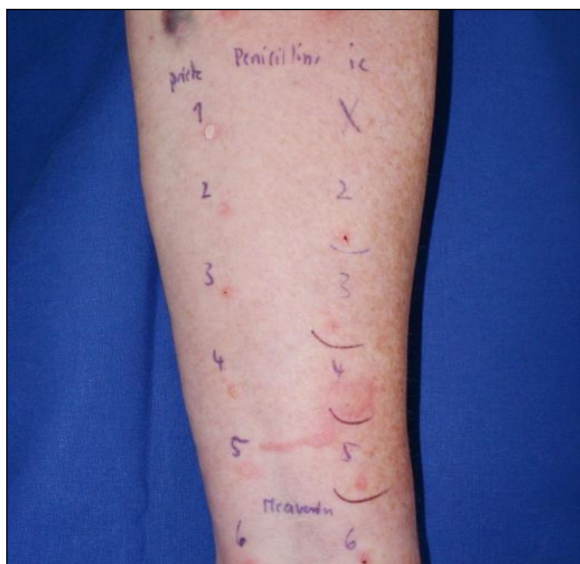


Abb. 12: Eindeutige Reaktion auf Amoxicillin (Quaddel-Nr.4) im Intrakutantest. Die Reaktion ist nach 20 Minuten im Intrakutantest aufgetreten und mit ++++ bewertet worden. Anamnestisch hatte die Patientin zuvor auch auf Amoxicillin reagiert und dabei Quaddeln am ganzen Körper entwickelt die mit Übelkeit, Kreislaufproblemen und Bewusstlosigkeit einhergingen. Aufgrund der weiteren Untersuchungsergebnisse wurde diese Patientin zu Beginn von der oralen Provokationstestung ausgeschlossen.



Abb. 13: Nach oraler Provokationstestung zeigt sich an unterschiedlichen Stellen des Integument (hier dorsal des rechten Oberarms) ein Exanthem nach Provokation mit dem Batactamantibiotikum Clindamycin.

Tab. 4: Reaktionen der Allergiker aus Gruppe 1 und 2 im Überblick

Patient	Gruppe	Klinik	Sytemische Reaktion	Prick-/Intra-cutantest	IgE	ECT	OPT
Pat. 1	1	Urtikaria/ Quinke- Ödem	Kopfschmerzen Unwohlsein Schwäche	+	-	-	Roxithromycin E ¹ 300mg/G ² 500mg (Ausweichantibiotikum) Abbruch
Pat. 2	1	Urtikaria/ Quinke- Ödem	-	+	-	-	Phenoxyphenicilli n 1,2g Cefuroxim 500mg (Ausweichantibiotikum) Keine Reaktion

Patient	Gruppe	Klinik	Sytemische Reaktion	Prick-/Intra-cutantest	IgE	ECT	OPT
Pat. 3	1	Urtikaria	Übelkeit Erbrechen Durchfall	+	-	-	Cefixim E ¹ _{200mg} / G ² _{320mg} Clindamycin E ¹ _{600mg} / G ² _{920mg} (Ausweichantibiotika) Abbruch
Pat. 4	1	Urtikaria	Übelkeit Kreislaufdysregulation mit Synkope	+	-	-	nicht durchgeführt
Pat. 5	1	Urtikaria	-	+	-	-	Doxycyclin E ¹ _{100mg} / G ² _{200mg} (Ausweichantibiotikum) Keine Reaktion
Pat. 1	2	Makulopapulöses Exanthem	-	-	-	+*	Nicht durchgeführt
Pat. 2	2	Makulopapulöses Exanthem	-	+*	-	+*	Nicht durchgeführt
Pat. 3	2	Makulopapulöses Exanthem	-	+*	-	Nicht durchgeführt	Nicht durchgeführt
Pat. 4	2	Makulopapulöses Exanthem	-	+*	-	+*	Nicht durchgeführt
Pat. 5	2	Makulopapulöses Exanthem	-	-	-	+*	Cefixim (Ausweichantibiotikum) E ¹ _{400mg} / G ² _{1200mg} Keine Reaktion
Pat.6	2	Makulopapulöses Exanthem	-	+*	-	+*	Cefixim (Ausweichantibiotikum) 400mg/400mg Keine Reaktion
Pat. 7	2	Makulopapulöses Exanthem	-	+*	-	+*	Nicht durchgeführt

Patient	Gruppe	Klinik	Sytemische Reaktion	Prick-/Intra-cutantest	IgE	ECT	OPT
Pat. 8	2	Makulopapulöses Exanthem	-	-	-	+	Nicht durchgeführt
Pat.1	keine	AGEP	-	-	-	+	Nicht durchgeführt

E¹: Einzelhöchstdosis

G²: kumulative Gesamtdosis

* Ablesung nach 48 und/oder 72 h

Die Tabelle (4) zeigt die Patienten der Gruppe 1 und 2 und deren Reaktionen in den einzelnen Tests.

5.2 Unterschiede humoraler Faktoren nach Betalactamexposition/- testung

5.2.1 Bestimmung der Gesamt- und spezifischen Immunglobulin-E-Konzentration in allen vier Probandengruppen

Mit Hilfe des ImmunoCap-Systems wurden die Konzentrationen an Gesamt-IgE und der Penicillin G-, Penicillin V-, Ampicillin- und Amoxicillin-spezifischen IgE-Antikörper im Serum der Patienten bestimmt. In den vier Probandengruppen wurden keine Konzentrationen an spezifischen IgE größer 0,1kUA/l detektiert. Auch bei der Messung der Gesamt-IgE-Antikörperkonzentrationen konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Durch die Antikörper-Diagnostik konnten die Soforttypallergiker somit nicht von den anderen drei Gruppen abgegrenzt werden.

5.3 Veränderungen zellulärer Faktoren nach Betalactamexposition/-testung

5.3.1 Frequenzen Betalactam-spezifischer T-Zellpopulationen nach Stimulation mit dem jeweiligen Betalactamantibiotikum

Das Vorkommen unterschiedlicher T-Zellpopulationen im peripheren Blut wurde mittels Elispot-Assay untersucht. Nach Betalactam- bzw. PHA-Stimulation wurde die Anzahl der Zellen, die durch die Sekretion eines spezifischen Markerzytokins charakterisiert war, mit Hilfe des ELISPOT-Assays quantitativ erfasst (Abb.14). Durch die Freisetzung der Zytokine IFN- γ , IL-5 und IL-10 konnten die Zellen spezifischen T-Zellsubpopulationen zugeordnet werden. IFN- γ -Spots repräsentieren hierbei Betalactam-spezifische Th1-Zellen, IL-5⁺ Spots Th2-Zellen. Die Produktion des Zytokins IL-10 nach Antibiotikastimulation gab einen Hinweis auf das Vorkommen möglicher Betalactam-spezifischer Tr1-Zellen.




	Unstimulierte Kontrolle	+200µg/ml Amoxicillin	+PHA
IFN- γ (Th1)	 33 spots	 64 spots	 140 spots

Abb. 14: Frequenzbestimmung der zytokinsezernierenden T-Zellen mittels ELISPOT Verfahren. In der Abbildung ein charakteristischer ELISPOT-Assay am Beispiel des Nachweises von IFN- γ -produzierenden Zellen. Es wurden drei unterschiedliche Ansätze durchgeführt (die unstimulierte (Negativ-) Kontrolle, Stimulation mit dem jeweiligen Betalactamantibiotikum, auf das der Patient im Epikutantest eine Sensibilisierung zeigt (hier Amoxicillin 200µg/ml; alternativ wurde mit 200µg/ml Benzylpenicillin oder 50µg/ml Cefuroxim stimuliert) und mit Phyohämagglutinin (PHA) als Positivkontrolle. Die verschiedenen Ansätze dienten der Berechnung von CD4⁺T-Zellen, die eine spezifische Immunantwort auf Betalactamantibiotika zeigten. Dabei wurden die *Spots* der unstimulierten Kontrolle von den betalactamstimulierten Proben abgezogen, das Ergebnis reflektiert die Anzahl an *Spots* pro 2×10^5 peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).

Das Zytokin IFN- γ wird hauptsächlich von CD4⁺ Th1-Zellen gebildet. Doch andere Zellen wie Monozyten/Makrophagen, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen produzieren ebenfalls dieses Zytokin. Da nicht nur Th1-Zellen, sondern auch die NK-T-Zellen den Oberflächenmarker CD4 besitzen, können IFN- γ -*Spots* theoretisch auch durch NK-T-Zellen hervorgerufen worden sein. IL-5 wird überwiegend von CD4⁺ Th2-Zellen gebildet, allerdings kann es auch von Eosinophilen und Mastzellen sezerniert werden. IL-10 wird den Tr1-Zellen zugeordnet, allerdings gibt es auch eine Vielzahl von weiteren Zellpopulationen die das Zytokin produzieren, hierzu zählen u.a. Th2-Zellen, Foxp3⁺ Treg-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und NK-T-Zellen.

Entsprechend nach der in (Abb.14) veranschaulichten Vorgehensweise wurden die zytokinproduzierenden Zellen mittels ELISPOT nach Stimulation mit dem jeweiligen Betalactamantibiotikum, auf das bei den Patienten der Gruppen 1 oder 2 eine Allergie bestand, bestimmt. Um eine maximale Stimulation der einzelnen Zellen zu erreichen, wurden für das Betalactamantibiotikum (Amoxicillin, Benzylpenicillin und Cefuroxim) unterschiedliche Konzentrationen bei Probanden aus den Gruppen 1 und 2 ausgetestet. Es wurden für Benzylpenicillin und Amoxicillin Ansätze mit 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml und 1mg/ml

ausgetestet. Bei Amoxicillin zeigte sich, dass bei der Konzentration von 200µg/ml die größte Anzahl an Antibiotika-spezifischen *Spots* für alle drei T-Zell-assoziierten Zytokine (IL-5, IFN-γ und IL-10) im ELISPOT detektiert werden konnte (Abb. 15). Bei 1mg/ml konnte dagegen kein *Spot* detektiert werden, sodass anzunehmen ist, dass diese Konzentration einen toxischen Effekt zur Folge hatte. Die gleichen Konzentrationen wurden auch für Benzylpenicillin ausgetestet. Hier zeigten sich vergleichbare Ergebnisse, weswegen ebenfalls die Konzentration von 200µg/ml Benzylpenicillin für die nachfolgenden ELISPOTS verwendet wurde. Cefuroxim wurde mit den Ansätzen 2µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml, 50µg/ml und 100µg/ml ausgetestet. Hier zeigten sich bei 50µg/ml Cefuroxim die häufigste Anzahl Antibiotika-spezifischer *Spots*. Eine Konzentration ab 200µg/ml konnte eindeutig als zu hoch angesehen werden, da nur wenig *Spots* detektiert werden konnten.

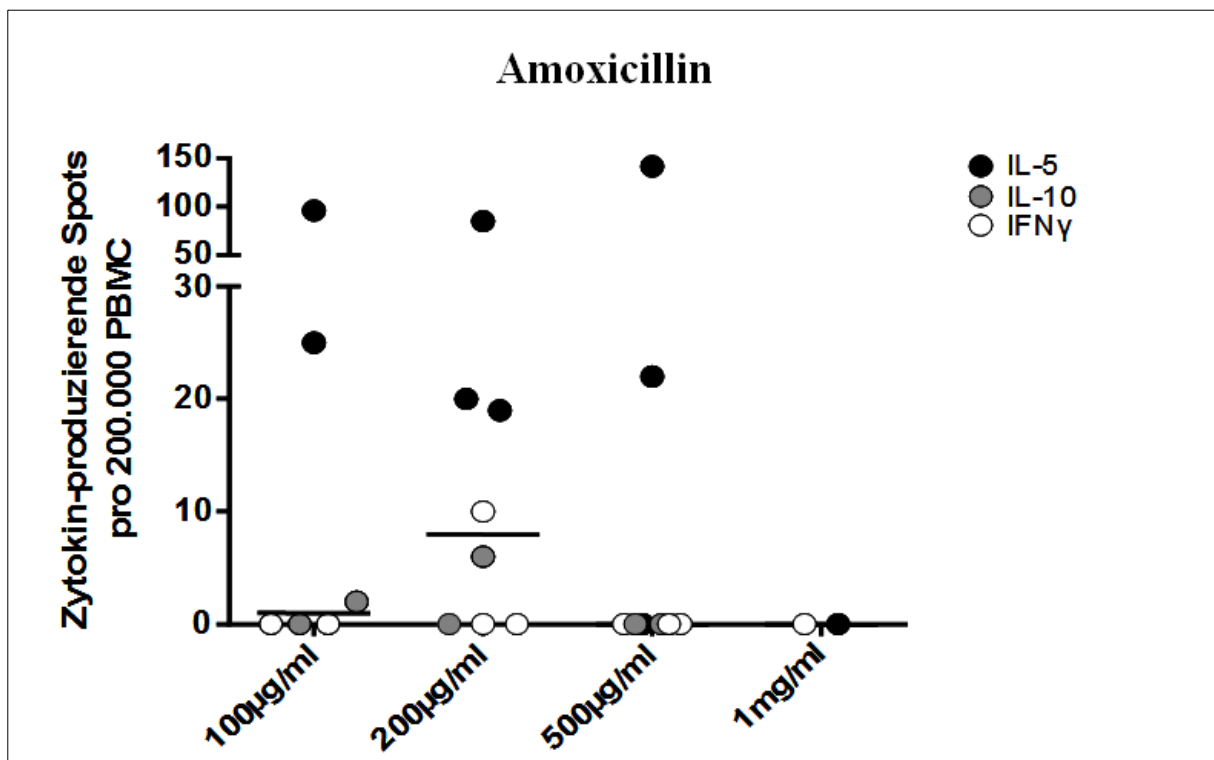


Abb. 15: Beispielgrafik mit den unterschiedlichen Konzentrationsansätzen für das Antibiotikum Amoxicillin. Bei einer Konzentration von 200µg/ml konnten für die unterschiedlichen Zytokine (IL-5, IL-10 und IFN-γ) die meisten *Spots* detektiert werden.

In der Gruppe 1 (n=5) ließ sich ein Anstieg der Betalaktam-spezifischen IL5-produzierenden Zellen beobachten, aufgrund der geringen Fallzahl konnte allerdings keine Signifikanz berechnet werden. Bei den anderen Gruppen zeigten sich keine deutlichen Zunahmen der IL-5 sezernierenden T-Zellen (Abb.16).

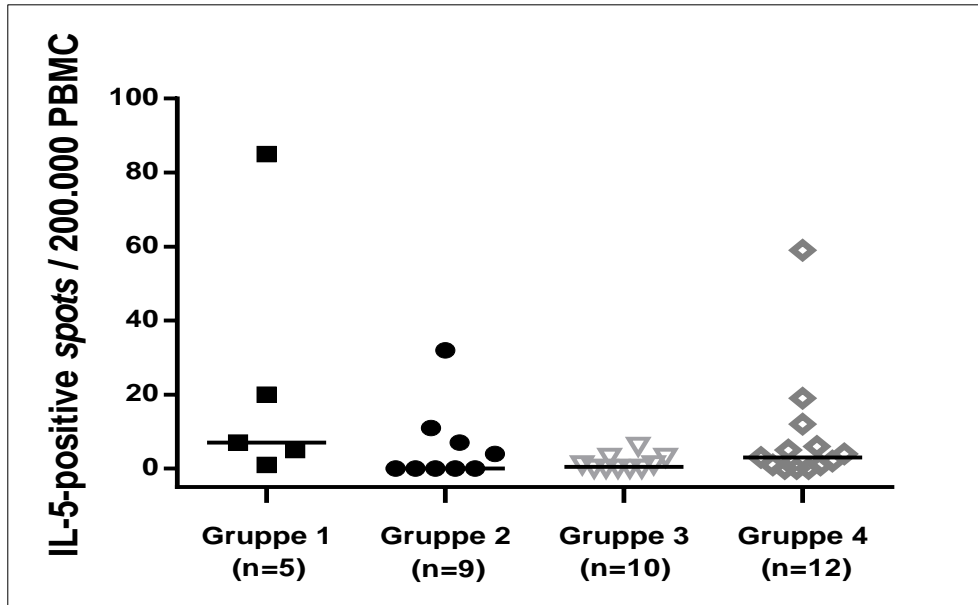


Abb. 16: Die Frequenzen Interleukin (IL)-5-produzierender Th2-Zellen in den vier Probandengruppen. Eine tendenzielle Zunahme Betalaktam-spezifischer (IL)-5-produzierender Zellen konnte in der Gruppe 1 nach Antibiotikastimulation gesehen werden. In den anderen Gruppen zeigten sich keine deutlichen Anstiege.

Die Frequenz von Betalactam-spezifischen IFN- γ -sezernierenden Zellen war weder in der Gruppe 1 noch 2 erhöht, während sich für einzelne Probanden der Kontrollgruppen 3 und 4 höhere Zellzahlen fanden (Abb.17).

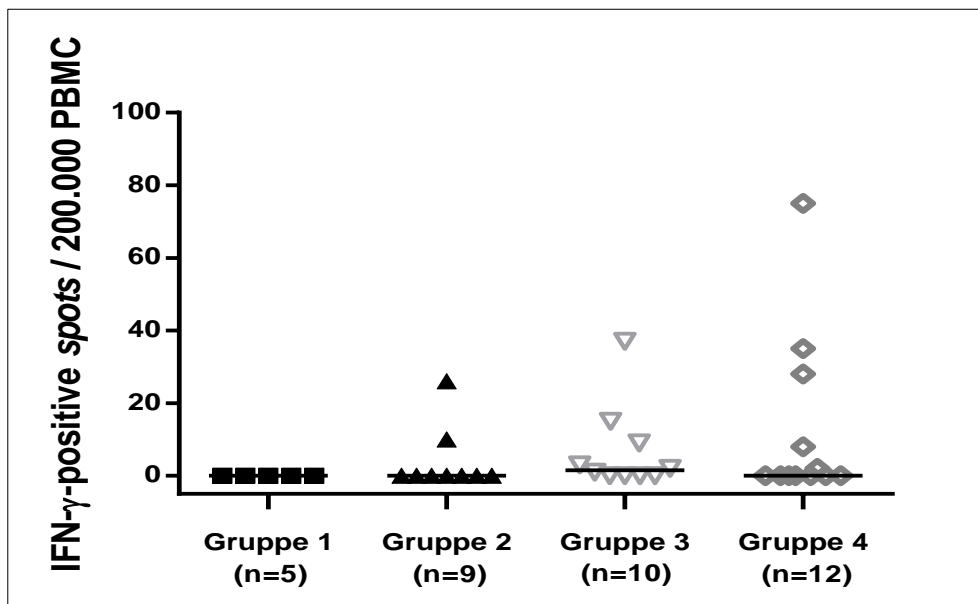


Abb. 17: Die Frequenzen IFN- γ -produzierender Th1-Zellen in den vier Probandengruppen. Weder in der Gruppe 1 noch 2 fanden sich vermehrt Betalaktam-spezifische, IFN- γ -produzierende Th-1-Zellen. Eine tendenzielle Erhöhung der Zellzahl war bei den Kontrollgruppen 3 und 4 zu sehen.

Die Stimulation mit den Betalactamantibiotika führte zu keinen wesentlichen Zunahmen der Betalaktam-spezifischen IL-10-sezernierenden Zellen in den verschiedenen Probandengruppen (Abb.18)

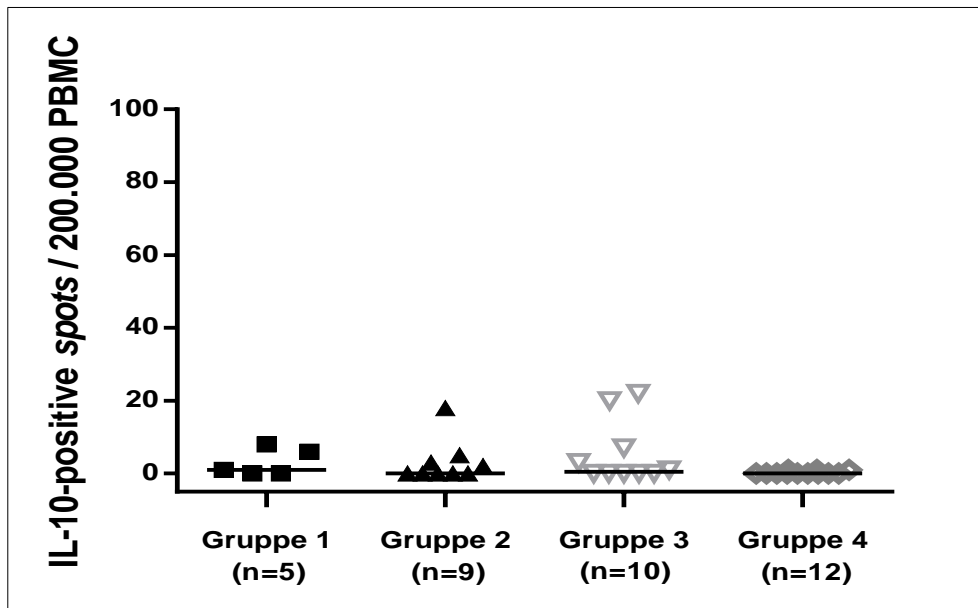


Abb. 18: Die Frequenzen Interleukin (IL)-10-produzierender T-Zellen in den vier Probandengruppen. In allen vier Gruppen konnte keine vermehrte Anzahl Betalaktam-spezifischer IL-10-produzierender T-Zellen beobachtet werden.

5.3.2 Frequenzen von Amoxicillin-spezifischen T-Zellpopulationen bei Nicht-allergischen Patienten unter Antibiotikatherapie

Die Gruppe 3 bestand aus Patienten, die aufgrund eines operativen Eingriffs (Entfernung eines Basalioms) prophylaktisch für 3 Tage Amoxicillin erhielten (2x1000 mg/Tag). Es kam zu einer allmählichen, jedoch letztendlich nicht signifikanten Zunahme IFN- γ -produzierender, Amoxicillin-spezifischer Th1-Zellen innerhalb des 3-tägigen Behandlungsverlaufs (Abb.19a).

Bei der Frequenz von IL-5-sezernierenden Zellen war nur am 2. Tag eine leichte Zunahme der Amoxicillin-spezifischen Th2-Zellen zu erkennen, allgemein war jedoch kein signifikanter Unterschied über den Behandlungszeitraum von drei Tagen zu sehen. Beim Frequenzverlauf der Tr1-Zellen konnte an am dritten Tag eine tendenzielle Zunahme der Betalaktam-spezifischen IL-10-produzierenden T-Zellen beobachtet werden.

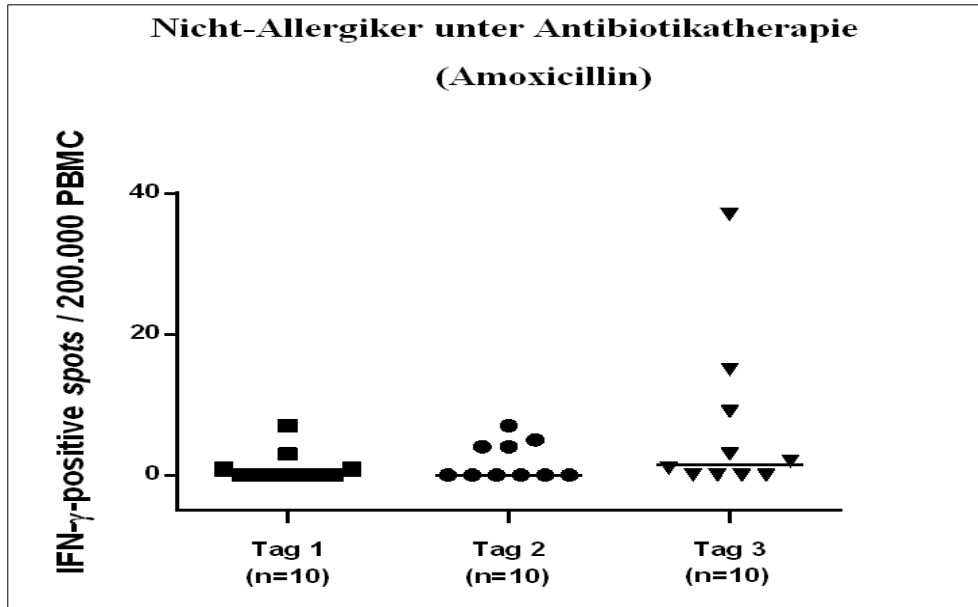


Abb. 19: Veränderung IFN- γ -sezernierender Th1-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe. Es zeigte sich eine geringe Zunahme IFN- γ -produzierender Amoxicillin-spezifischer CD4⁺-Zellen am 3. Tag der Amoxicillingabe, die aber nicht signifikant war.

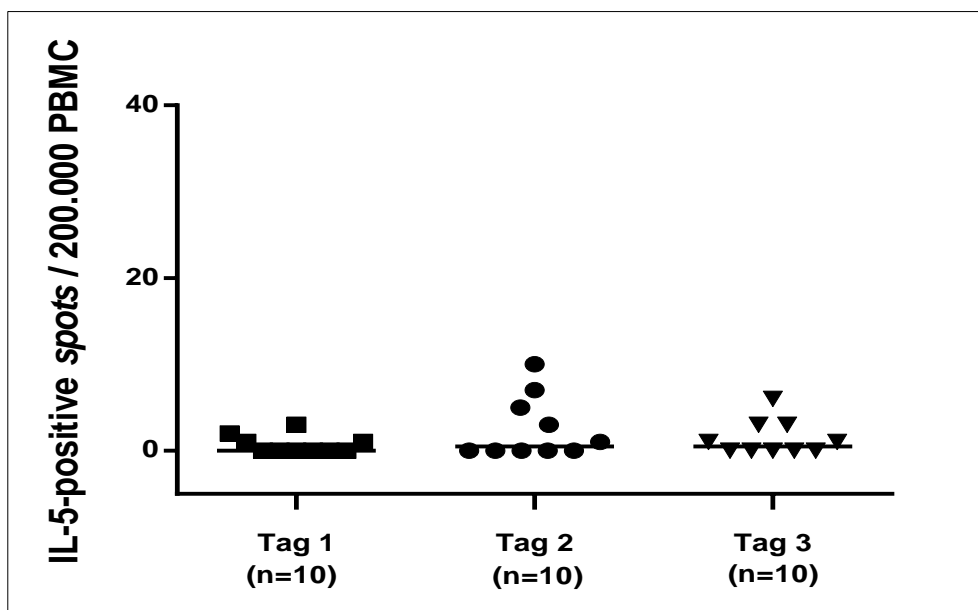


Abb. 20: Veränderung IL-5-sezernierender Amoxicillin-spezifischer Th2-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe. Es zeigt sich eine minimale Zunahme der Amoxicillin-spezifischen IL-5 produzierenden Th2-Zellen am 2. Tag der systemischen Amoxicillingabe.

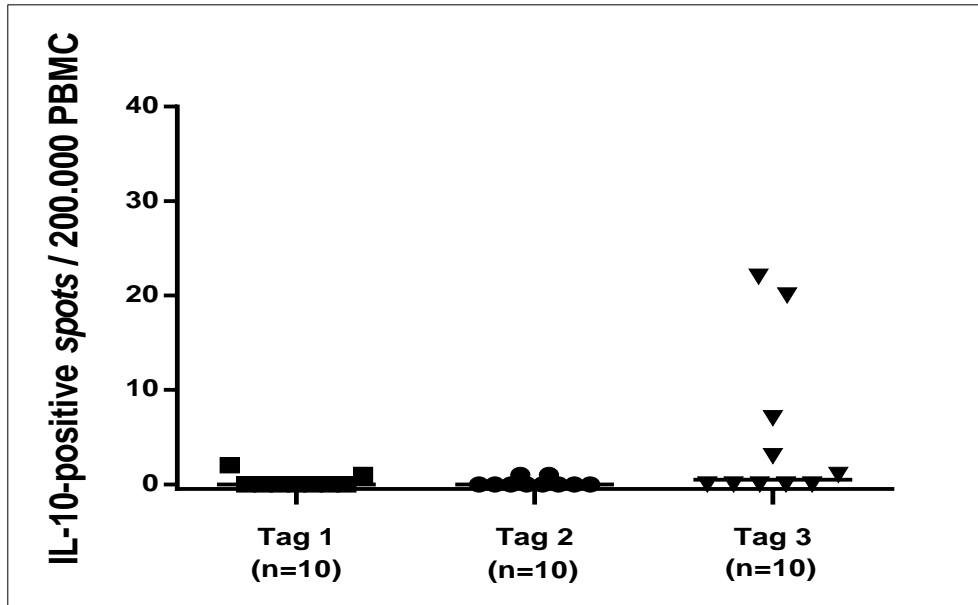


Abb. 21: Veränderung IL-10-sezernierender Tr1-Zellen in der Gruppe 3 unter systemischer Amoxicillingabe. Es zeigt sich eine geringe Zunahme von Amoxicillin-spezifischen IL-10⁺ T-Zellen am 3. Tag der systemischen Amoxicillingabe.

5.3.3 Proportionale Veränderungen der Betalaktam-spezifischen T-Zellsubpopulationen

Von besonderer Bedeutung für die Auswirkungen auf ein Krankheitsbild scheint das Verhältnis unterschiedlicher T-Zellpopulationen zueinander zu sein (Akdis, Verhagen et al. 2004). So wird davon ausgegangen, dass eine Normalisierung des Ungleichgewichts unterschiedlicher Allergen-spezifischer T-Zellpopulationen zu einer Verbesserung eines allergischen Krankheitsbildes führen könnte. Aus diesem Grund wurde das Verhältnis zwischen pathologischen, Betalaktam-spezifischen Th1 und Th2-Zellen zu den potentiell protektiven Tr1-Zellen bestimmt. Des Weiteren wurde das Verhältnis zwischen Th1 und Th2-Zellen gegenüber gestellt. Der Quotient der Betalactam-spezifischen Th2-Zellen zu Tr1 blieb in den Gruppen 2, 3 und 4 unverändert. Ein leichter Anstieg des Verhältnisses war allerdings bei den Soforttypallergikern (Gruppe 1) zu beobachten. Insgesamt zeigten sich nach Stimulation mit dem Betalactamantibiotikum in allen vier Gruppen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede für das Th2- zu Tr1-Verhältnis. Das Verhältnis von Betalactam-spezifischen Th1-Zellen zu Tr1-Zellen und auch von Th1 zu Th2-Zellen war in allen 4 Gruppen gleichermaßen unverändert.

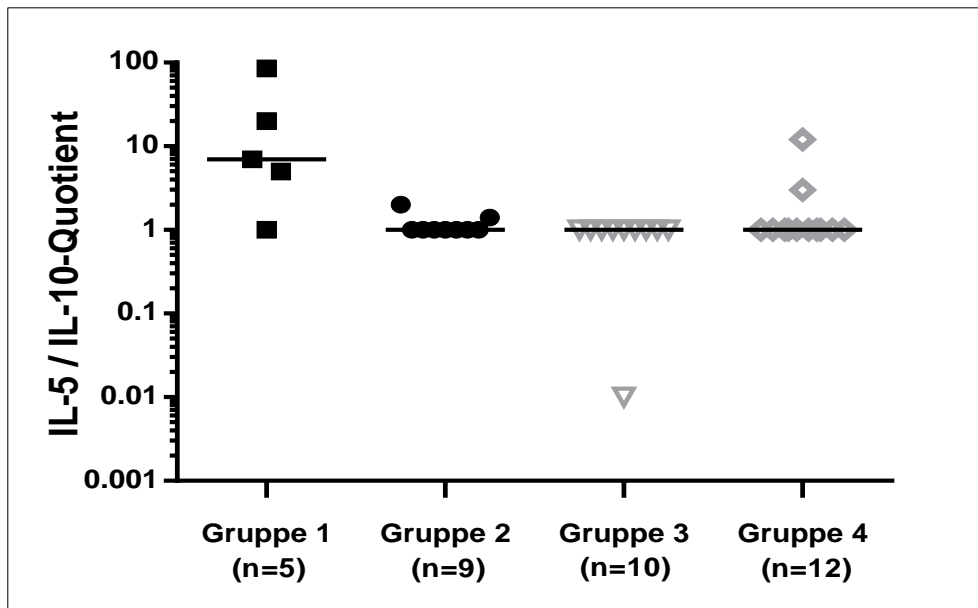


Abb. 22: Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-2-Zellen (Th2) zu Typ-1-regulatorischen T (Tr1)-Zellen. Innerhalb der einzelnen Gruppen zeigte sich bis auf die Soforttypallergikergruppe (Gruppe 1) keine Unterschiede des Verhältnisses IL-5 produzierender zu IL-10 produzierender Zellen.

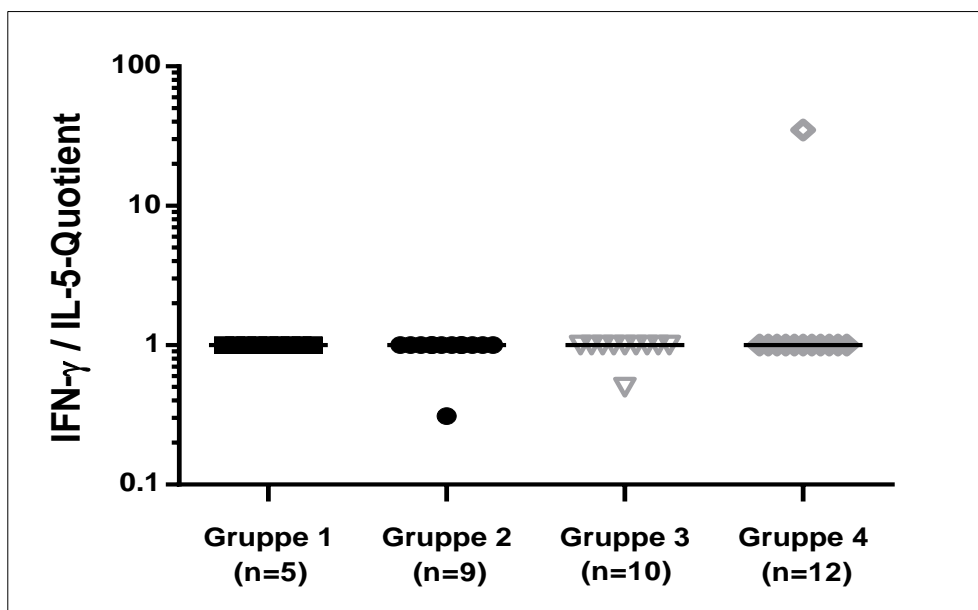


Abb. 23: Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-1-Zellen (Th1) zu T-Helfer-2-Zellen (Th2). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probandengruppen.

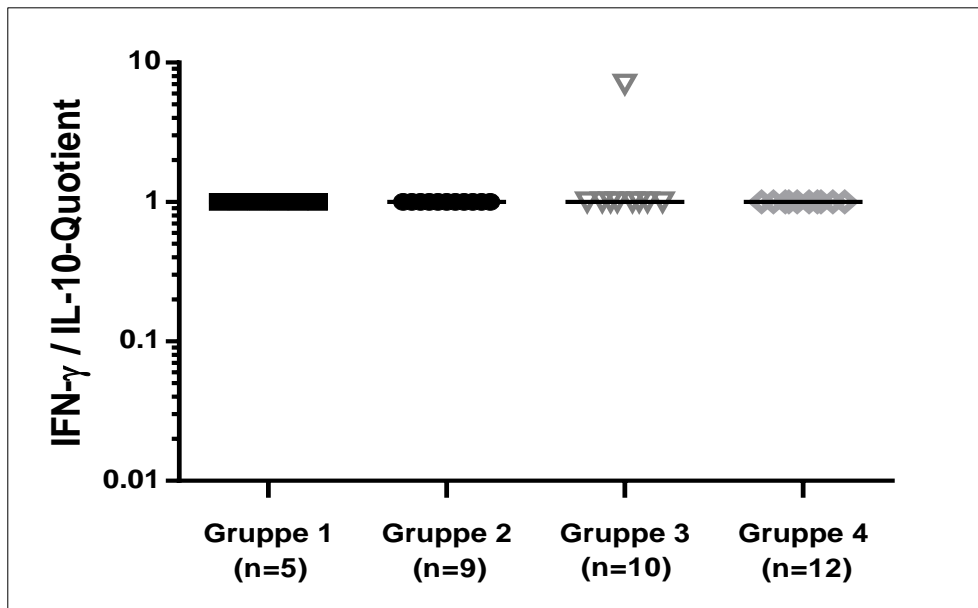


Abb. 24: Das Verhältnis von Betalaktam-spezifischen T-Helfer-1-Zellen (Th1) zu Typ-1-regulatorischen T-Zellen (Tr1). Es ließen sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Probandengruppen feststellen.

5.3.4 Der Einfluss von Betalactamantibiotika auf die Anzahl $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut

Da verschiedene Untersuchungen zeigen konnten, dass $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen durch die Herunterregulierung des Oberflächenantigens CD127 gekennzeichnet sind, wurde in der vorliegenden Studie die Kombination der Oberflächenexpression $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ als Markerprofil verwendet, um die Frequenz der $Foxp3^+$ Treg-Zellen zu bestimmen (Liu, Putnam et al. 2006; Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Um mögliche Unterschiede der Frequenz der Treg-Zellpopulationen zwischen den einzelnen Patientengruppen (Soforttypallergiker = Gruppe 1, Spättypallergiker = Gruppe 2) und Kontrollgruppen zu detektieren, wurde die Anzahl der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen im peripheren Blut der Patienten aus den vier verschiedenen Gruppen direkt nach Blutentnahme analysiert.

Die durchflusszytometrische Messung zeigte keine Veränderung der Treg-Zellen bei den Patienten der 2 Allergikergruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (Abb. 21a). In der Gruppe 3 kam es während der dreitägigen Einnahme von Betalactamantibiotika zu einer Abnahme der Anzahl von $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen (Abb. 21b).

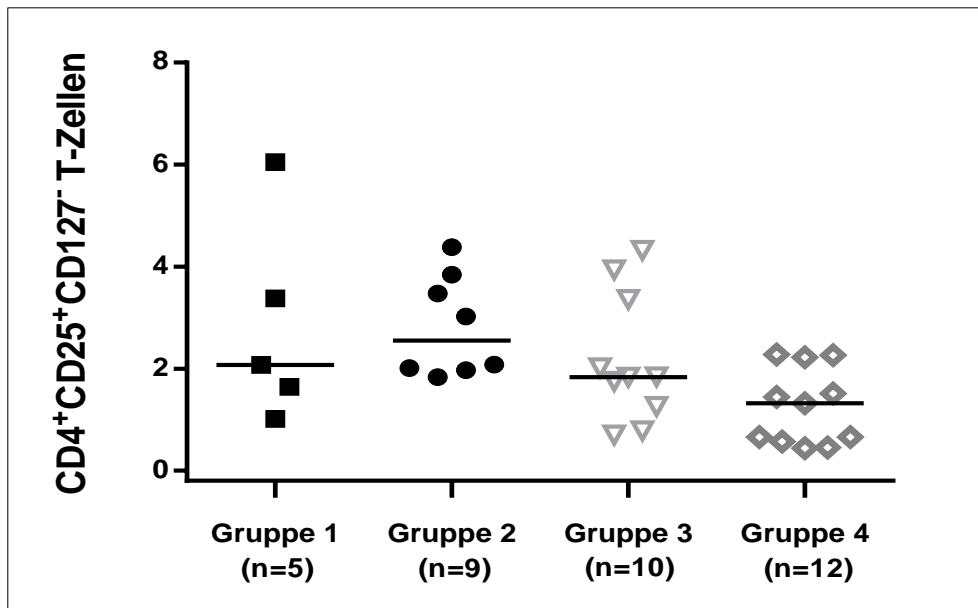


Abb. 25: Der Frequenzverlauf von $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen in den unterschiedlichen Untersuchungsgruppen. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung zwischen den Allergikergruppen im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

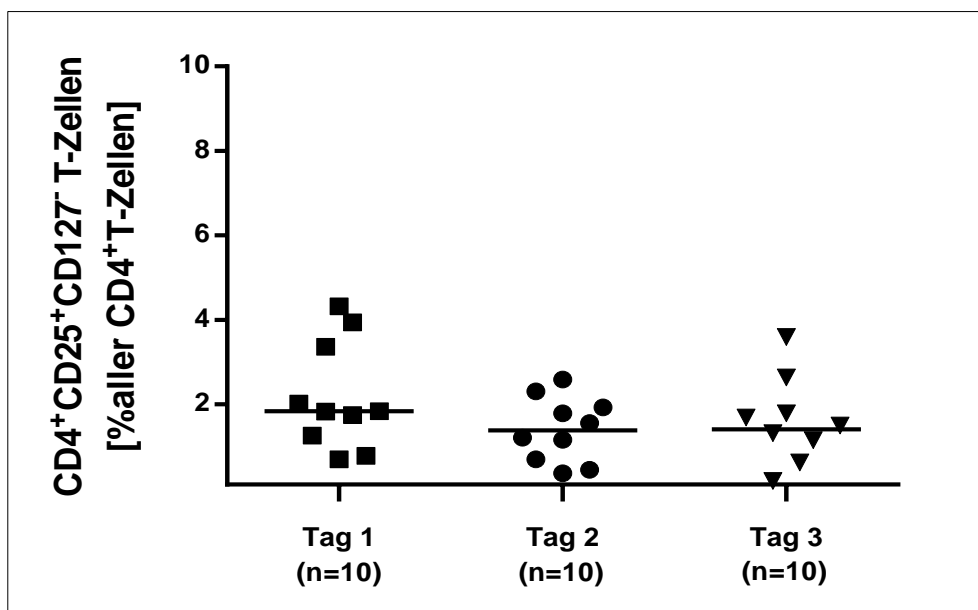


Abb. 26: Der Frequenzverlauf von $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen in der Gruppe 3 unter dreitägiger systemischer Amoxicillingabe. Es zeigt sich eine geringgradige Abnahme regulatorischer T-Zellen vom ersten auf den zweiten Tag, danach bleibt die Frequenz weitestgehend unverändert.

6 Diskussion

Die Arzneimittelallergie hat in der jüngeren Vergangenheit sukzessive an Relevanz gewonnen. Sie führt zu einer immunologisch vermittelten Überempfindlichkeit auf ein Medikament, die sich nach den zugrunde liegenden Pathomechanismen als allergische Soforttypreaktion oder als Reaktion vom Spättyp zeigen kann.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Betalactamantibiotika gehören zu den häufigsten Auslösern allergischer Medikamentenreaktionen. Der Pathomechanismus einer Soforttypreaktion auf Betalaktamantibiotika entspricht einer klassischen IgE-vermittelten Reaktion. Im Rahmen der Sensibilisierungsphase kommt es zur Ausbildung allergenspezifischer IgE-Antikörper durch B-Lymphozyten, die auf Mastzellen gebunden werden und nach Quervernetzung durch das Antibiotikum die Freisetzung von Histamin und proinflammatorischen Mediatoren induzieren. Hiervon abgrenzen lässt sich die Spättypreaktion, bei der es zur Aktivierung Betalaktam-spezifischer T-Lymphozyten und zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommt. Sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Lymphozyten spielen eine wesentliche Rolle bei der Spättypreaktion. Des Weiteren zeigte sich in einer unlängst publizierten Studie eine Zunahme Betalaktam-spezifischer, $IFN-\gamma$ -sezernierender T-Zellen bei Spättypallergikern (Rozières, Vocanson et al. 2009). Bisher wurden jedoch nur wenige Studien zu den immunmodulatorischen Mechanismen bei Betalaktamantibiotika-Allergie durchgeführt (Beeler, Engler et al. 2006; Rozières, Vocanson et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden daher klinische und T-zelluläre Untersuchungen zum besseren Verständnis der Sofort- und Spättyp-Allergie auf Betalaktamantibiotika durchgeführt. Die Patienten wurden mittels unterschiedlicher allergologischer Testverfahren, wie Hauttests (Prick-, Intrakutan-, Epikutantest) und orale Provokationstests genauer charakterisiert. Sodann wurden in vitro Betalaktam-spezifische Antikörper im Serum und, die Frequenzen Betalaktam-spezifischer Th1, Th2 und Treg-Zellpopulationen bestimmt. Daraus resultierend konnten die spezifischen T-zellulären und humoralen Veränderungen bei Spättypallergikern im Vergleich zu anderen Studienkohorten (Soforttyp-Allergiker, gesunde Probanden) evaluiert werden. Die T-Zellfrequenzen wurden anhand ihrer typischen Markerzytokine $IFN-\gamma$, IL-5, IL-10 erfasst und gemessen.

Im Ergebnis dieser Studie zeigte sich eine unauffällige humorale Antwort bei den Probandengruppen. Auf zellulärer Ebene zeigte sich interessanterweise keine Zunahme $IFN-\gamma$ -sezernierender T-Zellen bei den Spättypallergikern, während sich die postulierte gesteigerte

Th2-Zellantwort bei den Soforttypallergikern bestätigen ließ. Darüber hinaus konnte ein geringer Anstieg Betalaktam-spezifischer, IFN- γ -produzierender T-Zellen bei den gesunden Kontrollgruppen, unabhängig ob diese mit einem Betalaktam-Antibiotika behandelt wurden oder nicht, beobachtet werden. Eine Induktion Betalaktam-spezifischer Tr1-Zellen ließ sich in keiner Gruppe feststellen. Unter 3-tägiger Amoxicillingabe zeigte sich in der Gruppe 3 ein tendenzieller Anstieg von IL-10⁺ und IFN- γ ⁺ Zellen am dritten Tag, wobei sich spekulieren lässt, ob die Zunahme Betalaktam-spezifischer Tr1-Zellen eine protektive Immunmodulation bei ansonsten tendenziell begünstigter Entwicklung einer Betalaktam-induzierten Th1-Immunantwort darstellt. Zusätzlich wurde in der Studie die Frequenz der CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Zellen in den einzelnen Gruppen untersucht, wobei sich eine tendenzielle Abnahme dieser Treg-Population in der Gruppe 3 während der dreitägigen systemischen Betalaktamtherapie zeigte.

Bei der Bewertung der zuvor benannten Punkte muss berücksichtigt werden, dass es sich bei der vorliegenden Studie um eine Pilotstudie handelt, deren Ergebnisse aufgrund der schwierigen Patientenrekrutierung nur durch eine relativ niedrige Probandenzahl repräsentiert wird und mithin eine hohe Variabilität der Resultate bedingen kann. Diese sollen im Folgenden diskutiert werden.

6.1 Humorale Veränderungen

In der vorliegenden Studie wurde bei den Studienteilnehmern eine Untersuchung der spezifischen IgE-Antikörper gegen Penicillin, Amoxicillin und Ampicillin durchgeführt und die jeweiligen Unterschiede in den einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Bei einer Allergie vom Soforttyp bilden die Patienten spezifische IgE-Antikörper aus, die in kleinen Mengen im Serum vorkommen. Die Antikörper setzen sich an die IgE-Rezeptoren histaminbeladener Zellen, wie Mastzellen und basophile Granulozyten, die vermehrt in Haut und Schleimhäuten vorliegen. Treffen die entsprechenden Allergene auf die IgE-besetzten Effektorzellen, kommt es zur Quervernetzung zwei benachbarter IgE-Moleküle, die Zellen werden aktiviert und es kommt zur Ausschüttung u.a. von Histamin. Dieser Entzündungsmediator ist letztendlich für die Entstehung allergischer Sofortsymptome verantwortlich und kann zu einer Konjunktivitis, Rhinitis oder Asthma bronchiale führen. Die Kreuzvernetzung von IgE durch Allergene ist somit das Schlüsselereignis der Allergie vom Soforttyp (Jin, Hantusch et al. 2008).

Im Rahmen der aktuellen Studie ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von allergenspezifischen IgE-Antikörpern in allen vier Gruppen nach

Antibiotikastimulation nachweisen. Auch bei den Soforttypallergikern, bei denen eine erhöhte allergenspezifische IgE-Konzentration auf das jeweilige reagierende Antibiotikum zu erwarten gewesen wäre, zeigte sich kein Unterschied gegenüber den Spättyp-Allergikern oder gesunden Kontrollen. Auch bei der Gesamt-IgE-Konzentrationen fand sich kein Unterschied zu den Vergleichsgruppen, was bei einer Typ-I-Reaktion im Rahmen einer atopischen Diathese zu erwarten gewesen wäre, da erhöhte IgE-Konzentrationen die Diagnose von Atopikern untermauern (Kjellman 1987). Somit zeigte sich im Gegensatz zu den Soforttyp-Reaktionen im Hauttest (Prick- und Intrakutantest) auf die Betalaktamantibiotika, die die Diagnose einer Soforttyp-Allergie ermöglichten keine entsprechenden IgE-Werte im Serum.

Ein Grund für die fehlende IgE-Erhöhung könnte darin liegen, dass die Halbwertszeit von IgE-Antikörpern im Vergleich zu dem (für die Hauttests relevanten) zellgebundenen IgE als zu den anderen Ig-Subtypen deutlich kürzer ist (im Gegensatz zu den anderen Antikörperklassen weisen frei zirkulierende IgE-Antikörper nur eine sehr geringe Konzentration im Blutkreislauf und zeigen beispielsweise im Verhältnis zu den IgG-Antikörpern ein 10^4 -fache niedrigere Konzentration in gesunden Individuen (Taylor, Gould et al. 2008). Die Halbwertszeit des IgE im peripheren Blut beträgt 2-3 Tage, wohingegen die IgE-Antikörper, die an Mastzellen gebunden sind, im Blut zirkulieren und eine Lebensdauer von mehreren Jahren aufweisen (Platts-Mills, Vaughan et al. 2001). Die Patienten könnten daher entsprechend der Anamnese noch eine positive Reaktion im Prick- und Intrakutantest auf persistierendes Betalaktamspezifisches IgE auf Mastzellen zeigen, während die Serum-IgE-Konzentration aufgrund des häufig schon sehr weiten zeitlichen Abstands zur ursprünglichen Arzneimittelreaktion nicht mehr ausreichend messbar gewesen war.

In den beiden gesunden Kohorten, den Nicht-Allergikern mit und ohne Betalactamantibiotikatherapie sowie den Spättypallergikern waren keine erhöhten Betalaktamspezifische bzw. Gesamt-IgE-Konzentrationen zu erwarten gewesen.

6.2 T-Zelluläre Veränderungen nach Betalactamstimulation

6.2.1 Der Einfluss von Betalactamantibiotikum auf T-Helfer-Zellen

In den letzten Jahren wurde die immunologische Forschung durch das Th1-Th2-Paradigma geprägt. Unterschiedliche Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Pathogenese einer allergischen Erkrankung auf die Fehlbalance zwischen Th1 und Th2-Zellimmunantworten zurückzuführen sein könnte.

Die physiologische Funktion von Th1-Zellen besteht in der T-Zell-vermittelten proinflammatorischen Bekämpfung von intrazellulären Bakterien und Viren, pathophysiologisch spielen sie eine bedeutsame Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen und chronischen Ekzemen bzw. Kontaktallergien. Die Th1-Zellen sind durch die Ausschüttung des Markerzytokins IFN- γ gekennzeichnet, welches ein pleiotropes Zytokin darstellt und eine Reihe von Immunantworten induziert bzw. modelliert.

Die Th2-Zell-Immunantwort hingegen spielt eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung extrazellulärer Pathogene. Durch die Effektorzytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind Th2-Zellen an vielen Pathomechanismen beteiligt, unter anderem an der Antikörperbildung, insbesondere am Klassenwechsel hin zum IgE, und an der Proliferation von Eosinophilen und deren Funktionen.

In unterschiedlichen Untersuchungen zeigte sich, dass die allergische Inflammation mit einer verstärkten Th2-Zellantwort assoziiert ist und dass die Abwesenheit von immunkompetenten Th1-Antworten, speziell die Herunterregulierung von IFN- γ , die Entwicklung von allergischen Erkrankungen fördert (Iwamoto, Nakajima et al. 1993; Cohn, Homer et al. 1999; Dow, Schwarze et al. 1999). Daher war die Detektion und Quantifizierung Betalaktam-spezifischer Th1- und Th2-Zellen über deren assoziierte Markerzytokine nach entsprechender Allergenstimulation in dieser Studie von besonderem Interesse.

Interessanterweise zeigte sich allerdings, dass die Spätypallergiker keine erhöhte Frequenz von IFN- γ -produzierenden Betalaktam-spezifischen Th1-Zellen aufwiesen. Dies steht im Gegensatz zu einer anderen Studie, die eine vermehrte Präsenz von zirkulierenden Betalaktam-spezifischen T-Zellen bei Spätypallergikern im IFN- γ ELISPOT-assay berichtete (Rozieres, Vocanson et al. 2009). Ursache für die in dieser Untersuchung gefundene geringe IFN- γ -Antwort könnte sein, dass die Spätypallergiker ausschließlich über Antibiotika-spezifische IFN- γ -Produktion charakterisiert wurden. Eine Studie von Pichler et al. zeigte jedoch, dass es unterschiedliche Subtypen von Spätypallergikern gibt und die erhöhte IFN- γ -Sekretion nur einem Subtyp entspricht. So können auch andere Zytokine, welche nicht nur von CD4⁺ T-Zellen sondern auch von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen gebildet werden eine Antibiotika-induzierte Spätyp-Reaktion bedingen (Pichler 2003). Aktuelle Forschungen der Arbeitsgruppe Klinisch-Experimentelle Allergologie von Professor Pfützner unter Anwendung des ELISPOT-Verfahrens zeigen beispielsweise, dass bei vielen Spätypallergikern eine vermehrte Granzym B-Antwort durch CD8⁺T-Zellen zu beobachten ist.

Einen tendenziellen Anstieg allergenspezifischer Th1-Zellen innerhalb der PBMC konnte bei den gesunden Kontrollgruppen detektiert werden. Frühere Studienergebnisse aus anderen Untersuchungen sahen eine Verschiebung von Th2-Zellen in Richtung Th1-Zellen als allgemein entscheidend an, um die Entstehung einer Allergie zu verhindern. Dieses Paradigma gilt nur für die IgE-vermittelte Soforttypallergie. Diese Annahme beruhte auf der Kenntnis der entgegengesetzten Funktion und Wirkung der Zytokine IL-4 bzw. IL-5 (Th2-spezifisch) und IFN- γ (Th1-spezifisch) (Kay 2001; Wong, Ho et al. 2001). So wird IFN- γ in Bezug auf die mögliche Entwicklung einer Soforttypallergie eine protektive Eigenschaft zugeschrieben, indem es die Produktion von IL-4 und IL-5 durch Th2-Zellen inhibiert, da es den T-bet-Transkriptor aktiviert, der wiederum für Th1-Zellen aktivierend und auf Th2-Zellen supprimierend wirkt (Afkarian, Sedy et al. 2002; Hazlett, Rudner et al. 2002). Auch Szabo et al. konnte bereits im Jahr 2000 feststellen, dass eine Expression des Transkriptionsfaktors T-bet zu einer Suppression von IL-4 und IL-5 in Th2-Zellen führt (Szabo, Kim et al. 2000). Des Weiteren wurde in Untersuchungen herausgefunden, dass bei einer fehlerhaften IFN- γ -Produktion eine Prädisposition für allergische Erkrankungen vom Soforttyp vorlag. So ergab eine Studie, dass Patienten mit einem starken Asthma - im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen - eine signifikant reduzierte IFN- γ -Produktion nach Allergengabe aufzeigten (Leonard, Sherman et al. 1997; Renzi, Turgeon et al. 1999). Kontrovers diskutiert wird jedoch in vereinzelt Studien, ob ein physiologischer IFN- γ -Spiegel oder aber eine Reduktion der Th2-Zytokinproduktion im Zusammenhang mit der Verhinderung einer Allergie stehen (Smart and Kemp 2002); (Möbs 2010).

IFN- γ nimmt zwar eine entscheidende Rolle in der Hemmung einer Th2-Antwort durch die o.g. T-bet-Expression ein, aber auch der Verlust von IL-4-Rezeptoren, der durch IFN- γ verursacht wird, ist ein weiterer Mechanismus, der eine Suppression und dadurch eine Polarisierung in Richtung einer nicht allergischen Reaktion hervorruft (Huang and Paul 1998). In der vorliegenden Studie war eine geringe Zunahme von IFN- γ -produzierenden T-Zellen in den gesunden Kontrollgruppen zu beobachten. Daher stellt sich die Frage, ob ein Anstieg des Zytokins IFN- γ bei gesunden Patienten möglicherweise einen protektiven Mechanismus darstellt, um eine Soforttyp-Allergie, die durch IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktionen einen wesentlich bedrohlicheren Verlauf als eine Spättyp-Allergie nehmen kann, gar nicht erst entstehen zu lassen.

Des Weiteren wäre zu diskutieren, wieso Gruppe 3 und 4 nicht den gleichen Frequenzanstieg von IFN- γ produzierenden T-Zellen aufzeigten. Eine Erklärung könnte das höhere Lebensalter

der Gruppe 3 sein. Da es sich hier um ein Kollektiv handelte, das im Rahmen eines operativen Eingriffs zur Entfernung eines Basalzellkarzinoms (diese werden selten vor dem 50. Lebensjahr diagnostiziert (Ilona J. Frieden 2011)), lag das Durchschnittsalter in der Gruppe 3 bei 72,1 Jahren im Vergleich zu der Kontrollgruppe 4 mit 39,0 Jahren. Die allgemeine adaptive Immunantwort schwächt sich longitudinalen Studien zufolge mit steigendem Alter ab, so dass das adaptive Immunsystem insgesamt durch den Alterungsprozess negativ beeinflusst wird (Nikolich-Zugich and Rudd; Nikolich-Zugich and Rudd 2010). Die Ursache für die Immunoseneszenz im Alter ist die Rückbildung der Thymuszellen und der sich daraus ergebende Verlust an neu gebildeten T-Zellen, die sich wiederum zu antigenspezifischen T-Zellen entwickeln können (Altmeyer, Barthel et al.; Altmeyer, Barthel et al. 2010). Durch Untersuchungen bei älteren Patienten, die das 100. Lebensjahr erreicht hatten, wurden Parameter gefunden die mit dem bei älteren Menschen in der Regel stattfindenden, fortschreitenden „Verschleiß“ konform gehen. Hierzu zählen bspw. die Verringerung der Anzahl von B- und T-Lymphozyten, während andere Parameter wie die Chemotaxis und Phagozytose weitgehend intakt bleiben (Goldmann, Lehne et al.; Goldmann, Lehne et al. 2010). Daher könnte ein Grund für die geringere Frequenz von Betalaktam-spezifischen Th1-Zellen in der Gruppe 3 im Vergleich zur Gruppe 4 das erhöhte Lebensalter in der erstgenannten Gruppe sein.

6.2.2 Regulatorische T-Zellen

$CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen sind wichtige Regulatoren für entstehende Immunantworten. Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, vermitteln Sie eine suppressive Funktion durch die Produktion von Zytokinen wie TGF- β und IL-10 sowie durch Zell-Zell-Kontakt (Buckner; Collison, Workman et al. 2007). Der Haupttranskriptionsfaktor $Foxp3^+$ wird in thymusgenerierten $CD4^+$ Treg-Zellen gebildet und im Anschluss verlassen die naiven $Foxp3^+$ Treg-Zellen den Thymus und zirkulieren in der Peripherie in sekundäre lymphatische Gewebe.

Eine weitere Gruppe von Treg-Zellen, die so genannten adaptiven bzw. induzierten Tregs (iTreg-Zellen), werden direkt in der Peripherie durch Antigene induziert (Ding, Xu et al. 2012). Aufgrund der unterschiedlichen Entstehungsmechanismen besteht die Hypothese, dass beide Treg- Zellpopulationen verschiedene Funktionen aufzeigen, und es wird spekuliert, dass die adaptiven Treg-Zellen eine entscheidende Rolle bei der immunologisch vermittelten Protektion von Gewebsschäden nach chronischer Exposition gegenüber Fremdanigenen spielen (Ziegler 2008).

6.2.2.1 Typ-1-regulatorische T-Zellen

Humane Studien von Akdis et al. haben gezeigt, dass allergenspezifische Tr1-Zellen einen dominierenden Zelltyp in gesunden Individuen nach Allergenexposition darstellen (Jutel, Akdis et al. 2003; Akdis, Verhagen et al. 2004). Eine ungewollte Immunreaktion auf nichtpathogene Umweltantigene, die Allergien induzieren, soll durch antigenspezifische Tr1-Zellen verhindert werden (Akkoc, Akdis et al. 2011). Diese Daten werden allerdings kontrovers diskutiert, da andere Studien das o.g. Ergebnis nicht bestätigen konnten. So zeigte sich bspw. in einer Studie mit Birkenpollenallergikern bei der gesunden Kontrollgruppe kein Anstieg von Allergen-spezifischen Tr1-Zellen nach Exposition mit Birkenallergen (Möbs 2010). Auch in der vorliegenden Studie fand sich keine Zunahme von IL-10 produzierenden Zellen unter Antibiotikaexposition durch Gabe von Amoxicillin in nicht-allergischen Probanden. Eine Theorie besagt, dass es in gesunden und allergischen Individuen drei Zelltypen gibt, Th1-, Th2- und Tr1-Zellen, die in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegen und das gleiche Antigen erkennen (Platts-Mills, Vaughan et al. 2001; Meiler, Klunker et al. 2008). Die Entstehung einer Allergie kommt hiernach durch eine veränderte Balance des Verhältnisses von Th2- zu Tr1-Zellen zustande. Je nach vorherrschendem Zelltyp kann sich eine Allergie entwickeln (Th2-Anstieg) oder vor dieser geschützt werden (Tr1-Anstieg) (Platts-Mills, Vaughan et al. 2001; Meiler, Klunker et al. 2008). Nach dieser Hypothese spielen Tr1-Zellen eine Schlüsselrolle in der Toleranzinduktion gegenüber Allergenen, Auto-Transplantaten und Tumorantigenen (Akkoc, de Koning et al. 2008).

Antigenspezifische Tr1-Zellen zeichnen sich durch ihre hohe Expression des supprimierenden Zytokins IL-10 aus und sind vor allem funktionell von Foxp3⁺ Treg-Zellen durch die kontaktunabhängige Inhibition des Teff-Zellwachstums in Kokultivierungsversuchen zu unterscheiden (Möbs 2010). In der vorliegenden Studie fanden sich jedoch ähnliche Frequenzen der Betalaktam-spezifischen, IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen in allen vier Gruppen. Allerdings zeigte sich in der Gruppe 3 während der dreitägigen Antibiotikatherapie eine tendenzielle Erhöhung der Betalaktam-spezifischen IL-10 produzierenden Tr1-Zellen am dritten Tag Amoxicillingabe. Es könnte sein, dass eine Antibiotikatherapie bei Nichtallergikern zu einer langsam zunehmenden Induktion protektiver IL-10-sezernierender Tr1-Zellen führt. Ein ähnliches Phänomen zeigt sich beispielsweise bei Soforttyp-Allergikern im Rahmen einer Toleranzinduktion durch regelmäßige Allergenzufuhr bei der spezifischen Immuntherapie. So konnte in einer Studie von Pereira-Santos, et al., ein Anstieg von antigenspezifischen Tr1-Zellen in Bienengiftallergikern durch eine Ultra-Rush-Therapie nach einem Jahr festgestellt werden (Pereira-Santos, Baptista et al. 2008). In einer anderen Studien zeigte sich eine signi-

fikante Zunahme von IL-10-sezernierenden Zellen wenige Wochen bis Monate nach Einleitung einer Allergen-spezifischen Immuntherapie (Bohle, Kinaciyan et al. 2007; Möbs 2010). Zum einen könnte es zu einer Expansion von Tr1-Zellen aus bereits bestehenden antigenspezifischen Th1- oder Th2-Gedächtniszellen gekommen sein, zum anderen könnte die Entstehung neuer Tr1-Zellen aus dem Pool naiver T-Zellen erfolgen (Roncarolo, Gregori et al. 2006). Möglicherweise hätten sich bei einer längeren Beobachtungsphase unter der Gabe von Amoxicillin auch signifikante Anstiege Amoxicillin-spezifischer IL-10 produzierender T-Zellen in der vorliegenden Studie gezeigt.

Neben der Zeitspanne der Allergenexposition stellt sich die Frage, ob eine höhere Amoxicillindosis zu einer verstärkten Induktion von Tr1-Zellen geführt hätte. In zwei Humanmodellen war das Ausmaß der Toleranzinduktion abhängig von der Höhe der applizierten Allergendosis (Meiler, Klunker et al. 2008). So zeigte sich bei nicht-allergischen Imkern, dass bei denen, die in der Imkersaison aufgrund vermehrter Bienenstiche einer erhöhten Bienengiftosis ausgesetzt waren, die bienengiftspezifischen Th1- und Th2-Zellen vermehrt in Richtung allergenspezifischer Tr1-Zellen wechselten. Auch führte die wiederholte Allergenexposition zu einer verminderten T-Zell-vermittelten Spätphasereaktion der Haut nach einem Bienenstich mit einer gleichzeitig verminderten allergenspezifischen T-Zellproliferation und Th1- bzw. Th2-Zytokinsekretion. Diese T-Zell-Veränderungen waren ca. 2-3 Monate nach Bienengiftexposition noch nachweisbar.

In einem anderen Model mit einer erhöhten Katzenhaarallergendosis wurde eine vermehrte IgG4-Antikörperantwort und eine Induktion IL-10-produzierender Tr1-Zellen beobachtet, ohne dass es im Anschluss zu einer neuen Sensibilisierung oder Asthmaentwicklung kam (Platts-Mills, Vaughan et al. 2001). Diese beiden Modelle deuten daraufhin, dass es durch die erhöhte und kontinuierliche Allergendosis zu einer in vivo-Expansion von IL-10-produzierenden, allergenspezifischen T-Zellen kommt, die zu erniedrigten Frequenzen von Th1- und Th2-Zellen führen kann. In Bezug auf die vorliegende Arbeit stellt sich daher die Frage, ob bei den Amoxicillin-behandelten Kontrollpersonen die Einnahme einer erhöhten Antibiotikakonzentration über einen verlängerten Zeitraum zu einer weiteren Induktion von IL-10-produzierenden Tr1-Zellen und gleichzeitig zu einer Erniedrigung bis hin zum Verlust einer Th1- und Th2-Antwort führen würde. Des Weiteren ist allerdings auch in Erwägung zu ziehen, dass bei der Arzneimittelallergie ein anderer Pathomechanismus als bei Aero- bzw. Insektengiftallergien vorliegen könnte, wie es ja bereits von Pichler postuliert wurde (s.o.).

6.2.2.2 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-Zellen unterscheiden sich von den oben beschriebenen Tr1-Zellen (vgl. 6.2.2.1) in der Funktion der Suppression. Die allergenspezifischen Tr1-Zellen inhibieren nach Stimulation zytokinabhängig, während die Suppression durch die Foxp3⁺ Treg-Zellen hauptsächlich zellkontaktabhängig erfolgt (Shevach 2002; Thornton, Piccirillo et al. 2004; von Boehmer 2005). Da die Foxp3⁺ Treg-Zellen kein definiertes Zytokinsekretionsmuster aufzeigen, kann diese Population nur mittels Expression ihrer Oberflächenmarker CD4⁺CD25⁺CD127^{low} sowie dem intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3⁺ charakterisiert und dadurch von anderen Treg-Zellen differenziert werden (Liu, Putnam et al. 2006). Die Frequenz der Foxp3⁺ Treg-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis der umgekehrten Proportionalität von CD127 zu dem intrazellulären Marker Foxp3⁺ ermittelt, da die Interaktion des CD127 Promoters und des Transkriptionsfaktors Foxp3⁺ zu einer verstärkten Expression von Foxp3⁺ in CD4⁺ T-Zellen und zu einer Reduktion von CD127 führt (Liu, Putnam et al. 2006; Seddiki, Santner-Nanan et al. 2006). Die Treg-Population umfasst somit neben den peripher induzierten Foxp3⁺ iTreg-Zellen auch die im Thymus generierten und im Anschluss in die Peripherie ausgewanderten Foxp3⁺ nTreg-Zellen.

Die Ergebnisse der aktuellen Arbeit zeigen im Vergleich der vier untersuchten Gruppen sehr geringe Veränderungen der Frequenzen der CD4⁺CD25⁺CD127^{low} Treg-Zellen, so konnte nur eine allenfalls leicht erhöhte Zellzahl bei der Spättypallergikergruppe gegenüber den anderen drei Gruppen festgestellt werden. Bezüglich des Frequenzverlaufs von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen nach Medikamentenstimulation gibt es bislang nur wenige Studien. Der Frequenzverlauf von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen wies in einer Studie von (Pichler, Daubner et al.; Pichler, Adam et al. 2011) eine ähnliche Tendenz auf wie in der vorliegenden Arbeit. Hier wurden die Frequenzen von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in verschiedenen Patientengruppen analysiert und miteinander verglichen. Zum Patientenkollektiv zählten Probanden mit einer mehrfachen Medikamentenallergie, einer Gruppe von Patienten mit einer Allergie auf ein Medikament (monoallergisch) und gesunden Kontrollen. Die Patienten zeigten unterschiedliche Erkrankungsbilder, die vom DRESS/DIHS bis zum MPE (*maculopapular drug eruption*) reichten. Die Altersspannweite erstreckte sich von 30-81 Jahren und die klinische Remission lag bei 4 Monaten bis zu 7 Jahren. Hierbei wurden erhöhte Werte von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen in der Gruppe der polysensibilisierten Arzneimittelallergiker gegenüber den gesunden Kontrollen gesehen (Daubner, Groux-Keller et al. 2012). Aufgrund der zuvor beschriebenen Ergebnisse könnte spekuliert werden, dass Spättypallergiker mit einer Antibiotikaallergie einen Frequenzanstieg von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen, wobei diskutiert wird, ob Spättyp-

Allergiker eine verminderte Suppressionskapazität der Treg-Zellen zeigen und daher trotz erhöhter Zellzahlen zum Allergiker werden. Letztlich gibt es wie eingangs erwähnt zu diesem Thema bislang nur wenige Studien, sodass es weiterer Studien bedarf, um dieses Ergebnis zu überprüfen.

In Studien mit Soforttypallergikern ging ein Anstieg von $CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen im Rahmen einer spezifischen Immuntherapie (SIT) allerdings mit einer Toleranzinduktion einher. So konnte bei Insektengiftallergikern unter SIT ein Anstieg peripherer $Foxp3^+$ Treg-Zellen detektiert werden (Pereira-Santos, Baptista et al. 2008). In einer weiteren Studie mit Graspollenallergikern nach zweijähriger SIT innerhalb der Gräserpollensaison zeigte sich ein signifikanter Anstieg von $CD25^+Foxp3^+$ Treg-Zellen in der nasalen Mukosa (Radulovic, Jacobson et al. 2008). Allerdings bleibt unklar, ob die Ergebnisse dieser zwei zuvor zitierten Studien Spättypallergiker übertragen werden können oder ob hier ein anderer Mechanismus vorliegt. Darüber hinaus haben andere Studien mit Soforttypallergikern diese Ergebnisse nicht bestätigen können. So ergab weder eine Studie mit Hausstauballergikern nach einjähriger SIT (Ajduk, Marinic et al. 2008) noch eine Studie mit Birkenpollenallergikern nach sechsmonatiger SIT (Grindebacke, Larsson et al. 2009) einen Frequenzanstieg der $CD4^+CD25^+$ Treg-Zellen. In der Arbeit von Möbs 2010 bei Birkenpollenallergikern nach dreijähriger SIT konnte zunächst kein Frequenzanstieg der $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ Treg-Zellen detektiert werden. Nach 30-monatiger SIT zeigte sich jedoch ein tendenzieller Anstieg der Treg-Zellen in den hyposensibilisierten Patienten (Möbs 2010), was wiederum dafür spricht, dass die Dauer der Allergenexposition einen Einfluss auf die Frequenz von Treg-Zellen haben kann.

Da bisher aber keine eindeutigen Erkenntnisse über den Anzahl der $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T-Zellen bei Allergikern und Gesunden vorliegen, sind weitere Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven notwendig, um den Einfluss einer Medikamentengabe auf die Zellfrequenz zu klären.

6.3 Fazit

Wie die vorliegende Pilotstudie zeigt, ist die Datenlage der Forschung im Rahmen der Spättypallergie noch sehr heterogen. Einer der Gründe mag darin liegen, dass die Spättypallergien bislang kaum Gegenstand vertiefter Forschung waren und es daher bislang wenige Ergebnisse gibt. Eine weitere Ursache könnte in der erschwerten Rekrutierung Arzneimittel-allergischer Patienten zu finden sein. Zudem sind die kausalen anamnestischen Zusammenhänge und kli-

nische Erscheinungsbilder retrospektiv oft nur sehr schwer nachvollziehbar (auch dieser Arbeit liegt nur eine niedrige Fallzahl zugrunde).

Da die Arzneimittelallergie in den letzten Jahren stetig an Bedeutung zugenommen hat, ist eine intensive Forschung in diesem Bereich von großer Bedeutung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben einige wichtige Ansatzpunkte für weitergehende Forschungen aufgezeigt. Entgegen der ursprünglichen Erwartung zeigten sich bei den Spätypallergikern keine erhöhten Frequenzen von IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen gegenüber den Vergleichskollektiven. Zukünftig sollte daher nicht nur auf das Markerzytokin IFN- γ geachtet werden, sondern auch auf die für zytotoxische CD8⁺ T-Zellen spezifischen Zytokine, wie Perforin und Granzym B, da davon auszugehen ist, dass bei einer Subpopulation an Spätypallergikern eine vermehrte Granzym B- und/oder Perforin-Antwort als entscheidende zugrunde Sekretionsaberration durch CD8⁺ T-Zellen zu verstehen ist.

Die vorliegende Arbeit zeigte zudem keine Veränderung des Frequenzverlaufs der IL-10-sezernierenden Tr1-Zellen. Damit konnte diese Studie die Ergebnisse von Akdis, der einen Anstieg von antigenspezifischen Tr1-Zellen in gesunden Individuen als essentiellen Mechanismus in der Toleranzinduktion gegenüber Allergenen beobachtete, zumindest zunächst nicht für Medikamentenexposition bestätigen. Allerdings konnte nach der dreitägigen Behandlung mit Amoxicillin in der Gruppe 3 ein leichter Anstieg von IL-10⁺ und IFN- γ ⁺ Zellen festgestellt werden, welcher wiederum ein Indiz für einen protektiven Mechanismus darstellen könnte.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte spekuliert werden, dass bei medikamenteninduzierten Spätypallergikern eine erhöhte Frequenz von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T-Zellen vorliegen. Da die Spätypallergie auch in diesem Punkt bislang nur wenig erforscht ist, bedarf es weiterer Studien, um zu klären, ob die höhere Anzahl an Treg-Zellen pathophysiologisch bedeutsam oder auf andere Immunmechanismen zurückzuführen ist.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., K. M. Murphy, et al. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Aberer, W., A. Bircher, et al. (2003). "Drug provocation testing in the diagnosis of drug hypersensitivity reactions: general considerations." Allergy **58**(9): 854-63.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells." Nat Immunol **3**(6): 549-57.
- Ajduk, J., I. Marinic, et al. (2008). "Effect of house dust mite immunotherapy on transforming growth factor beta1-producing T cells in asthmatic children." Ann Allergy Asthma Immunol **100**(4): 314-22.
- Akdis, C. A. and M. Akdis (2009). "Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells." J Allergy Clin Immunol **123**(4): 735-46; quiz 747-8.
- Akdis, M., J. Verhagen, et al. (2004). "Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells." J Exp Med **199**(11): 1567-75.
- Akkoc, T., M. Akdis, et al. "Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy." Allergy Asthma Immunol Res **3**(1): 11-20.
- Akkoc, T., M. Akdis, et al. (2011). "Update in the mechanisms of allergen-specific immunotherapy." Allergy Asthma Immunol Res **3**(1): 11-20.
- Akkoc, T., P. J. de Koning, et al. (2008). "Increased activation-induced cell death of high IFN-gamma-producing T(H)1 cells as a mechanism of T(H)2 predominance in atopic diseases." J Allergy Clin Immunol **121**(3): 652-658 e1.
- Aktories, K. F., U; Hofmann, F.B.; Starke, K. (2009). "Repititorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag, München."
- Altmeyer, M., M. Barthel, et al. "Absence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 delays the onset of Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced gut inflammation." Infect Immun **78**(8): 3420-31.
- Altmeyer, M., M. Barthel, et al. (2010). "Absence of poly(ADP-ribose) polymerase 1 delays the onset of Salmonella enterica serovar Typhimurium-induced gut inflammation." Infect Immun **78**(8): 3420-31.
- Ando, D. G., J. Clayton, et al. (1989). "Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype." Cell Immunol **124**(1): 132-43.
- Asero, R. (1998). "Detection of patients with multiple drug allergy syndrome by elective tolerance tests." Ann Allergy Asthma Immunol **80**(2): 185-8.
- Backstrom, M., T. Mjorndal, et al. (2004). "Under-reporting of serious adverse drug reactions in Sweden." Pharmacoepidemiol Drug Saf **13**(7): 483-7.

- Barbaud, A. (2005). "Drug patch testing in systemic cutaneous drug allergy." Toxicology **209**(2): 209-16.
- Barranco, P. and M. C. Lopez-Serrano (1998). "General and epidemiological aspects of allergic drug reactions." Clin Exp Allergy **28 Suppl 4**: 61-2.
- Basketter, D. A., G. F. Gerberick, et al. (1998). "Strategies for identifying false positive responses in predictive skin sensitization tests." Food Chem Toxicol **36**(4): 327-33.
- Bastuji-Garin, S., B. Rzany, et al. (1993). "Clinical classification of cases of toxic epidermal necrolysis, Stevens-Johnson syndrome, and erythema multiforme." Arch Dermatol **129**(1): 92-6.
- Beeler, A., O. Engler, et al. (2006). "Long-lasting reactivity and high frequency of drug-specific T cells after severe systemic drug hypersensitivity reactions." J Allergy Clin Immunol **117**(2): 455-62.
- Beeler, A. and W. J. Pichler (2006). "In vitro tests of T cell-mediated drug hypersensitivity." Expert Rev Clin Immunol **2**(6): 887-900.
- Beissert, S., A. Schwarz, et al. (2006). "Regulatory T cells." J Invest Dermatol **126**(1): 15-24.
- Bettelli, E., Y. Carrier, et al. (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-8.
- Bettelli, E., T. Korn, et al. (2008). "Induction and effector functions of T(H)17 cells." Nature **453**(7198): 1051-7.
- Bircher, A. (2007). " Stellenwert des Lymphozytentransformationstests in der Diagnostik der Arzneimittelallergie." Allergo Journal 2007.
- Black, C. A. (1999). "Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective." Dermatol Online J **5**(1): 7.
- Blease, K., C. Jakubzick, et al. (2001). "IL-13 fusion cytotoxin ameliorates chronic fungal-induced allergic airway disease in mice." J Immunol **167**(11): 6583-92.
- Bohle, B., T. Kinaciyan, et al. (2007). "Sublingual immunotherapy induces IL-10-producing T regulatory cells, allergen-specific T-cell tolerance, and immune deviation." J Allergy Clin Immunol **120**(3): 707-13.
- Bonnefoy, J. Y., J. F. Gauchat, et al. (1996). "Regulation of human IgE synthesis." Ann N Y Acad Sci **796**: 59-71.
- Borchers, A. T., J. L. Lee, et al. (2008). "Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis." Autoimmun Rev **7**(8): 598-605.
- Bottema, R. W., M. Kerkhof, et al. "X-chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts." Allergy **65**(7): 865-74.
- Brockow, K., A. Romano, et al. (2002). "General considerations for skin test procedures in the diagnosis of drug hypersensitivity." Allergy **57**(1): 45-51.

- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Buckner, J. H. "Mechanisms of impaired regulation by CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells in human autoimmune diseases." Nat Rev Immunol **10**(12): 849-59.
- Campbell, I. L., T. W. Kay, et al. (1991). "Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice." J Clin Invest **87**(2): 739-42.
- Carr, T. F. and C. A. Saltoun "Chapter 2: Skin testing in allergy." Allergy Asthma Proc **33 Suppl 1**: S6-8.
- Carr, T. F. and C. A. Saltoun (2012). "Chapter 2: Skin testing in allergy." Allergy Asthma Proc **33 Suppl 1**: S6-8.
- Cetinkaya, F. and Y. Cag (2004). "Penicillin sensitivity among children without a positive history for penicillin allergy." Pediatr Allergy Immunol **15**(3): 278-80.
- Chaabane, A., K. Aouam, et al. (2009). "[Allergy to betalactams: myth and realities]." Med Mal Infect **39**(5): 278-87.
- Chen, Y., V. K. Kuchroo, et al. (1994). "Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis." Science **265**(5176): 1237-40.
- Cohn, L., R. J. Homer, et al. (1999). "T helper 1 cells and interferon gamma regulate allergic airway inflammation and mucus production." J Exp Med **190**(9): 1309-18.
- Collison, L. W., C. J. Workman, et al. (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature **450**(7169): 566-9.
- Comte, D., S. Petitpierre, et al. "[Hymenoptera venom allergy: new diagnostic tools and management]." Rev Med Suisse **7**(291): 844-9.
- Cruse, H., C. Bartling, et al. (1995). "A modular artificial neural net for controlling a six-legged walking system." Biol Cybern **72**(5): 421-30.
- Curotto de Lafaille, M. A. and J. J. Lafaille (2009). "Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" Immunity **30**(5): 626-35.
- Czerkinsky, C. C., L. A. Nilsson, et al. (1983). "A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells." J Immunol Methods **65**(1-2): 109-21.
- Dabbagh, K., K. Takeyama, et al. (1999). "IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo." J Immunol **162**(10): 6233-7.
- Daubner, B., M. Groux-Keller, et al. (2012). "Multiple drug hypersensitivity: normal Treg cell function but enhanced in vivo activation of drug-specific T cells." Allergy **67**(1): 58-66.

- Davies, D. M., C. H. Ashton, et al. (1977). "Comprehensive clinical drug information service: first year's experience." Br Med J **1**(6053): 89-90.
- Del Prete, G., M. De Carli, et al. (1993). "Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production." J Immunol **150**(2): 353-60.
- Demoly, P. (2007). "[Drug allergies and drug hypersensitivities]." Rev Prat **57**(12): 1326-30.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, et al. (2002). "Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]." J Exp Med **196**(2): 247-53.
- Ding, Y., J. Xu, et al. (2012). "Regulatory T cell migration during an immune response." Trends Immunol **33**(4): 174-80.
- Dow, S. W., J. Schwarze, et al. (1999). "Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice." Hum Gene Ther **10**(12): 1905-14.
- Enzmann, H. (1980). "[Delayed allergic nasal reactions. (Synonyms: Coombs and Gell's type IV, delayed hypersensitivity, allergy of the tuberculin and eczema type). Studies on the morphology and pathogenesis]." Fortschr Med **98**(19): 745-51.
- Finotto, S., M. F. Neurath, et al. (2002). "Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet." Science **295**(5553): 336-8.
- Forster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs." Cell **99**(1): 23-33.
- French, L. E. (2006). "Toxic epidermal necrolysis and Stevens Johnson syndrome: our current understanding." Allergol Int **55**(1): 9-16.
- Fujio, K., T. Okamura, et al. "The Family of IL-10-secreting CD4+ T cells." Adv Immunol **105**: 99-130.
- Gabrielsson, S., A. Soderlund, et al. (2001). "Influence of atopic heredity on IL-4-, IL-12- and IFN-gamma-producing cells in in vitro activated cord blood mononuclear cells." Clin Exp Immunol **126**(3): 390-6.
- Garn, H. and H. Renz (2007). "Epidemiological and immunological evidence for the hygiene hypothesis." Immunobiology **212**(6): 441-52.
- Girolomoni, G. and S. Pastore (2001). "The role of keratinocytes in the pathogenesis of atopic dermatitis." J Am Acad Dermatol **45**(1 Suppl): S25-8.
- Goldmann, O., S. Lehne, et al. "Age-related susceptibility to Streptococcus pyogenes infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity." J Pathol **220**(5): 521-9.

- Goldmann, O., S. Lehne, et al. (2010). "Age-related susceptibility to *Streptococcus pyogenes* infection in mice: underlying immune dysfunction and strategy to enhance immunity." J Pathol **220**(5): 521-9.
- Gomes, E., M. F. Cardoso, et al. (2004). "Self-reported drug allergy in a general adult Portuguese population." Clin Exp Allergy **34**(10): 1597-601.
- Gomes, E. R. and P. Demoly (2005). "Epidemiology of hypersensitivity drug reactions." Curr Opin Allergy Clin Immunol **5**(4): 309-16.
- Gomez, E., M. J. Torres, et al. "Immunologic evaluation of drug allergy." Allergy Asthma Immunol Res **4**(5): 251-63.
- Gomez, E., M. J. Torres, et al. (2012). "Immunologic evaluation of drug allergy." Allergy Asthma Immunol Res **4**(5): 251-63.
- Gomez, M. B., M. J. Torres, et al. (2004). "Immediate allergic reactions to betalactams: facts and controversies." Curr Opin Allergy Clin Immunol **4**(4): 261-6.
- Gri, G., S. Piconese, et al. (2008). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction." Immunity **29**(5): 771-81.
- Grindebacke, H., P. Larsson, et al. (2009). "Specific immunotherapy to birch allergen does not enhance suppression of Th2 cells by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells during pollen season." J Clin Immunol **29**(6): 752-60.
- Gundel, R. H., L. G. Letts, et al. (1991). "Human eosinophil major basic protein induces airway constriction and airway hyperresponsiveness in primates." J Clin Invest **87**(4): 1470-3.
- Haddi, E., D. Charpin, et al. (1990). "Atopy and systemic reactions to drugs." Allergy **45**(3): 236-9.
- Halevy, S. (2009). "Acute generalized exanthematous pustulosis." Curr Opin Allergy Clin Immunol **9**(4): 322-8.
- Halken, S. (2004). "Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention." Pediatr Allergy Immunol **15 Suppl 16**: 4-5, 9-32.
- Hansen, S. R. and S. Kroon (2008). "[Patch testing and nickel allergy]." Tidsskr Nor Laegeforen **128**(4): 433-5.
- Hazlett, L. D., X. L. Rudner, et al. (2002). "Role of IL-12 and IFN-gamma in *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(2): 419-24.
- Hebenstreit, D., P. Luft, et al. (2003). "IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site." J Immunol **171**(11): 5901-7.

- Hirai, K., M. Yamaguchi, et al. (1990). "Enhancement of human basophil histamine release by interleukin 5." J Exp Med **172**(5): 1525-8.
- Hori, S., T. Takahashi, et al. (2003). "Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells." Adv Immunol **81**: 331-71.
- Howard, T. D., D. A. Meyers, et al. (2000). "Mapping susceptibility genes for asthma and allergy." J Allergy Clin Immunol **105**(2 Pt 2): S477-81.
- Huang, H. and W. E. Paul (1998). "Impaired interleukin 4 signaling in T helper type 1 cells." J Exp Med **187**(8): 1305-13.
- Huber, B. (2006). "[100 years of allergy: Clemens von Pirquet--his concept of allergy and his basic understanding of the disease: 2: The Pirquet concept of allergy]." Wien Klin Wochenschr **118**(23-24): 718-27.
- Humrich, J. and G. Riemekasten (2006). "[Regulatory T cells in rheumatic diseases]." Dtsch Med Wochenschr **131**(41): 2288-91.
- Ilona J. Frieden, M. D. a. L. F. E., M.D. (2011). "Pediatric dermatology." ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 40/58 (Dermatology); 76/115 (Pediatrics)
- Iwakura, Y., S. Nakae, et al. (2008). "The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens." Immunol Rev **226**: 57-79.
- Iwamoto, I., H. Nakajima, et al. (1993). "Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells." J Exp Med **177**(2): 573-6.
- Jäger, L. W., B.;Ballmer-Weber,B.;Vieths,S. (2000). "Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen: Immunologie - Diagnostik - Therapie - Prophylaxe. Urban & Fischer Verlag, Stuttgart."
- Janeway and K. M. M. P. T. M. Walport (2009). "Janeway Immunologie. Berlin, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg".
- Jin, C., B. Hantusch, et al. (2008). "Affinity of IgE and IgG against cross-reactive carbohydrate determinants on plant and insect glycoproteins." J Allergy Clin Immunol **121**(1): 185-190 e2.
- Johansson, S. G., T. Bieber, et al. (2004). "Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003." J Allergy Clin Immunol **113**(5): 832-6.
- Juan, W. H., L. C. Yang, et al. (2004). "Acute generalized exanthematous pustulosis induced by topical lindane." Dermatology **209**(3): 239-40.
- Jutel, M., M. Akdis, et al. (2003). "IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy." Eur J Immunol **33**(5): 1205-14.

- Kay, A. B. (2001). "Allergy and allergic diseases. First of two parts." N Engl J Med **344**(1): 30-7.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4**(4): 337-42.
- Kidon, M. I. and Y. See (2004). "Adverse drug reactions in Singaporean children." Singapore Med J **45**(12): 574-7.
- Kirchner, D. B. (2002). "The spectrum of allergic disease in the chemical industry." Int Arch Occup Environ Health **75 Suppl**: S107-12.
- Kjellman, N. I. (1987). "Food allergy--treatment and prevention." Ann Allergy **59**(5 Pt 2): 168-74.
- Klimek, L. and I. Bottcher (2008). "[T-cells regulate the immune-response in allergic rhinitis]." Laryngorhinootologie **87**(10): 733-43.
- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Korn, T., M. Oukka, et al. (2007). "Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties." Semin Immunol **19**(6): 362-71.
- Kramer, U., J. Heinrich, et al. (1999). "Age of entry to day nursery and allergy in later childhood." Lancet **353**(9151): 450-4.
- Lammintausta, K. and O. Kortekangas-Savolainen (2005). "The usefulness of skin tests to prove drug hypersensitivity." Br J Dermatol **152**(5): 968-74.
- Leonard, J. P., M. L. Sherman, et al. (1997). "Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production." Blood **90**(7): 2541-8.
- Lewis, S. A. (2000). "Animals and allergy." Clin Exp Allergy **30**(2): 153-7.
- Lindemann, M., J. Bohmer, et al. (2003). "ELISpot: a new tool for the detection of nickel sensitization." Clin Exp Allergy **33**(7): 992-8.
- Liu, W., A. L. Putnam, et al. (2006). "CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells." J Exp Med **203**(7): 1701-11.
- Majkowska-Wojciechowska, B., J. Pelka, et al. (2007). "Prevalence of allergy, patterns of allergic sensitization and allergy risk factors in rural and urban children." Allergy **62**(9): 1044-50.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-4.
- Mashishi, T. and C. M. Gray (2002). "The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes." Clin Chem Lab Med **40**(9): 903-10.

- Mayorga, C., R. R. Pena, et al. (2006). "Monitoring the acute phase response in non-immediate allergic drug reactions." Curr Opin Allergy Clin Immunol **6**(4): 249-57.
- Mayorga, C., M. J. Torres, et al. (2009). "Cutaneous symptoms in drug allergy: what have we learnt?" Curr Opin Allergy Clin Immunol **9**(5): 431-6.
- Meiler, F., S. Klunker, et al. (2008). "Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors." Allergy **63**(11): 1455-63.
- Messaad, D., H. Sahla, et al. (2004). "Drug provocation tests in patients with a history suggesting an immediate drug hypersensitivity reaction." Ann Intern Med **140**(12): 1001-6.
- Meves, A. (2006). "Intensivkurs Dermatologie.Elsevier / Urban & Fischer Verlag."
- Mittmann, N., S. R. Knowles, et al. (2004). "Evaluation of the extent of under-reporting of serious adverse drug reactions: the case of toxic epidermal necrolysis." Drug Saf **27**(7): 477-87.
- Möbs, C. (2010). "Zelluläre Mechanismen der Toleranzinduktion unter spezifischer Immuntherapie mit inhalativen Allergenen. Marburg, Philipps-Universität Marburg."
- Mockenhaupt, M., C. Viboud, et al. (2008). "Stevens-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis: assessment of medication risks with emphasis on recently marketed drugs. The EuroSCAR-study." J Invest Dermatol **128**(1): 35-44.
- Moll, I. (2010). "Dermatologie, Thieme Verlag."
- Mosmann, T. R., H. Cherwinski, et al. (2005). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986." J Immunol **175**(1): 5-14.
- Mosmann, T. R. and R. L. Coffman (1989). "TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties." Annu Rev Immunol **7**: 145-73.
- Mullen, A. C., A. S. Hutchins, et al. (2002). "Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction." Nat Immunol **3**(7): 652-8.
- Munthe-Kaas, M. C., K. H. Carlsen, et al. (2008). "T cell-specific T-box transcription factor haplotype is associated with allergic asthma in children." J Allergy Clin Immunol **121**(1): 51-6.
- Murphy, K. M. and S. L. Reiner (2002). "The lineage decisions of helper T cells." Nat Rev Immunol **2**(12): 933-44.
- Nelms, K., A. D. Keegan, et al. (1999). "The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions." Annu Rev Immunol **17**: 701-38.
- Neumann-Haefelin, C., H. C. Spangenberg, et al. (2004). "[Suppressor T-cells: immunologic regulator cells and clinical perspectives]." Dtsch Med Wochenschr **129**(30): 1627-30.

- Ng, W. F., P. J. Duggan, et al. (2001). "Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells." Blood **98**(9): 2736-44.
- Niggemann, B. "IgE-mediated latex allergy--an exciting and instructive piece of allergy history." Pediatr Allergy Immunol **21**(7): 997-1001.
- Niggemann, B. (2010). "IgE-mediated latex allergy--an exciting and instructive piece of allergy history." Pediatr Allergy Immunol **21**(7): 997-1001.
- Nikolich-Zugich, J. and B. D. Rudd "Immune memory and aging: an infinite or finite resource?" Curr Opin Immunol **22**(4): 535-40.
- Nikolich-Zugich, J. and B. D. Rudd (2010). "Immune memory and aging: an infinite or finite resource?" Curr Opin Immunol **22**(4): 535-40.
- Nonaka, M., N. Ogiwara, et al. (2008). "Combined stimulation of nasal polyp fibroblasts with poly IC, interleukin 4, and tumor necrosis factor alpha potently induces production of thymus- and activation-regulated chemokine." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **134**(6): 630-5.
- Oppenheim, J. and H. Fujiwara (1996). "The role of cytokines in cancer." Cytokine Growth Factor Rev **7**(3): 279-88.
- Padilla, A., R. Ferriols, et al. (2007). "[A time series analysis of the cost of the most common drug treatment groups in an intensive care unit]." Farm Hosp **31**(5): 307-10.
- Palomares, O., G. Yaman, et al. (2010). "Role of Treg in immune regulation of allergic diseases." Eur J Immunol **40**(5): 1232-40.
- Pamphilon, D. H. and M. L. Scott (2007). "Robin Coombs: his life and contribution to haematology and transfusion medicine." Br J Haematol **137**(5): 401-8.
- Pekkarinen, P. T., L. von Hertzen, et al. (2007). "A disparity in the association of asthma, rhinitis, and eczema with allergen-specific IgE between Finnish and Russian Karelia." Allergy **62**(3): 281-7.
- Pereira-Santos, M. C., A. P. Baptista, et al. (2008). "Expansion of circulating Foxp3(+)D25bright CD4+ T cells during specific venom immunotherapy." Clin Exp Allergy **38**(2): 291-7.
- Peterson, R. A. "Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression." Toxicol Pathol **40**(2): 186-204.
- Pichichero, M. E. and D. M. Pichichero (1998). "Diagnosis of penicillin, amoxicillin, and cephalosporin allergy: reliability of examination assessed by skin testing and oral challenge." J Pediatr **132**(1): 137-43.
- Pichler, W. J. (2003). "Delayed drug hypersensitivity reactions." Ann Intern Med **139**(8): 683-93.
- Pichler, W. J., J. Adam, et al. (2011). "Drug hypersensitivity reactions: pathomechanism and clinical symptoms." Med Clin North Am **94**(4): 645-64, xv.

- Pichler, W. J., B. Daubner, et al. "Drug hypersensitivity: flare-up reactions, cross-reactivity and multiple drug hypersensitivity." J Dermatol **38**(3): 216-21.
- Pichler, W. J. and J. Tilch (2004). "The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity." Allergy **59**(8): 809-20.
- Pichler, W. J., N. Yawalkar, et al. (2002). "Cellular and molecular pathophysiology of cutaneous drug reactions." Am J Clin Dermatol **3**(4): 229-38.
- Platts-Mills, T. A., J. W. Vaughan, et al. (2001). "Decreased prevalence of asthma among children with high exposure to cat allergen: relevance of the modified Th2 response." Mediators Inflamm **10**(6): 288-91.
- Pochard, P., P. Gosset, et al. (2002). "Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients." J Allergy Clin Immunol **110**(4): 617-23.
- Polansky, J. K. and J. Huehn (2007). "[To be or not to be a Treg: epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells]." Z Rheumatol **66**(5): 417-20.
- Ponvert, C., L. Le Clainche, et al. (1999). "Allergy to beta-lactam antibiotics in children." Pediatrics **104**(4): e45.
- Radulovic, S., M. R. Jacobson, et al. (2008). "Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4+ CD25+ cells in the nasal mucosa." J Allergy Clin Immunol **121**(6): 1467-72, 1472 e1.
- Rajan, T. V. (2003). "The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation." Trends Immunol **24**(7): 376-9.
- Renzi, P. M., J. P. Turgeon, et al. (1999). "Reduced interferon-gamma production in infants with bronchiolitis and asthma." Am J Respir Crit Care Med **159**(5 Pt 1): 1417-22.
- Riedl, M. A. and A. M. Casillas (2003). "Adverse drug reactions: types and treatment options." Am Fam Physician **68**(9): 1781-90.
- Riedler, J., W. Eder, et al. (2000). "Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization." Clin Exp Allergy **30**(2): 194-200.
- Robinson, D. S., Q. Hamid, et al. (1992). "Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma." N Engl J Med **326**(5): 298-304.
- Romagnani, S. (1991). "Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease." Int J Clin Lab Res **21**(2): 152-8.
- Romagnani, S. (1994). "Human TH1 and TH2 subsets: "eppur si muove"!" Eur Cytokine Netw **5**(1): 7-12.
- Romagnani, S. (2006). "Regulatory T cells: which role in the pathogenesis and treatment of allergic disorders?" Allergy **61**(1): 3-14.
- Romagnani, S., E. Maggi, et al. (1991). "Increased numbers of Th2-like CD4+ T cells in target organs and in the allergen-specific repertoire of allergic patients. Possible role of IL-4 produced by non-T cells." Int Arch Allergy Appl Immunol **94**(1-4): 133-6.

- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." Immunol Rev **212**: 28-50.
- Rozieres, A., A. Hennino, et al. (2009). "Detection and quantification of drug-specific T cells in penicillin allergy." Allergy **64**(4): 534-42.
- Rozieres, A., M. Vocanson, et al. (2009). "Role of T cells in nonimmediate allergic drug reactions." Curr Opin Allergy Clin Immunol **9**(4): 305-10.
- Ruby, P., F. Collette, et al. (2009). "Perspective taking to assess self-personality: what's modified in Alzheimer's disease?" Neurobiol Aging **30**(10): 1637-51.
- Saint-Mezard, P., F. Berard, et al. (2004). "The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis." Eur J Dermatol **14**(3): 131-8.
- Sakaguchi, S. (2003). "The origin of FOXP3-expressing CD4+ regulatory T cells: thymus or periphery." J Clin Invest **112**(9): 1310-2.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." Annu Rev Immunol **22**: 531-62.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-52.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, et al. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases." J Immunol **155**(3): 1151-64.
- Schaerli, P., M. Britschgi, et al. (2004). "Characterization of human T cells that regulate neutrophilic skin inflammation." J Immunol **173**(3): 2151-8.
- Schulz, E. G., L. Mariani, et al. (2009). "Sequential polarization and imprinting of type 1 T helper lymphocytes by interferon-gamma and interleukin-12." Immunity **30**(5): 673-83.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, et al. (2006). "Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells." J Exp Med **203**(7): 1693-700.
- Seitz, C. S., E. B. Brocker, et al. "Diagnosis of drug hypersensitivity in children and adolescents: discrepancy between physician-based assessment and results of testing." Pediatr Allergy Immunol **22**(4): 405-10.
- Shevach, E. M. (2002). "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." Nat Rev Immunol **2**(6): 389-400.
- Shevach, E. M., R. S. McHugh, et al. (2001). "Control of T-cell activation by CD4+ CD25+ suppressor T cells." Immunol Rev **182**: 58-67.

- Shiohara, T., M. Inaoka, et al. (2006). "Drug-induced hypersensitivity syndrome (DIHS): a reaction induced by a complex interplay among herpesviruses and antiviral and anti-drug immune responses." Allergol Int **55**(1): 1-8.
- Sidoroff, A., S. Halevy, et al. (2001). "Acute generalized exanthematous pustulosis (AGEP)--a clinical reaction pattern." J Cutan Pathol **28**(3): 113-9.
- Smart, J. M. and A. S. Kemp (2002). "Increased Th1 and Th2 allergen-induced cytokine responses in children with atopic disease." Clin Exp Allergy **32**(5): 796-802.
- Smith, R. J. and G. Aston-Jones (2008). "Noradrenergic transmission in the extended amygdala: role in increased drug-seeking and relapse during protracted drug abstinence." Brain Struct Funct **213**(1-2): 43-61.
- Stock, P., C. Rolinck-Werninghaus, et al. (2007). "The role of anti-IgE therapy in combination with allergen specific immunotherapy for seasonal allergic rhinitis." BioDrugs **21**(6): 403-10.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." Bmj **299**(6710): 1259-60.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-69.
- Taylor, A. I., H. J. Gould, et al. (2008). "Avian IgY binds to a monocyte receptor with IgG-like kinetics despite an IgE-like structure." J Biol Chem **283**(24): 16384-90.
- Terrados, S., M. Blanca, et al. (1995). "Nonimmediate reactions to betalactams: prevalence and role of the different penicillins." Allergy **50**(7): 563-7.
- Thong, B. Y., K. P. Leong, et al. (2003). "Drug allergy in a general hospital: Results of a novel prospective inpatient reporting system." Ann Allergy Asthma Immunol **90**(3): 342-7.
- Thornton, A. M., C. A. Piccirillo, et al. (2004). "Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function." Eur J Immunol **34**(2): 366-76.
- Torgerson, T. R. and H. D. Ochs (2007). "Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked: forkhead box protein 3 mutations and lack of regulatory T cells." J Allergy Clin Immunol **120**(4): 744-50; quiz 751-2.
- Torres, M. J., C. Mayorga, et al. (2009). "Nonimmediate allergic reactions induced by drugs: pathogenesis and diagnostic tests." J Investig Allergol Clin Immunol **19**(2): 80-90.
- Trautmann, A., M. Akdis, et al. (2000). "T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis." J Clin Invest **106**(1): 25-35.
- Trautmann, A., K. Kruger, et al. (2005). "Apoptosis and loss of adhesion of bronchial epithelial cells in asthma." Int Arch Allergy Immunol **138**(2): 142-50.
- Uter, W., J. Hegewald, et al. (2005). "The European standard series in 9 European countries, 2002/2003 -- first results of the European Surveillance System on Contact Allergies." Contact Dermatitis **53**(3): 136-45.

- Viinanen, A., S. Munhbayarlah, et al. (2007). "The protective effect of rural living against atopy in Mongolia." Allergy **62**(3): 272-80.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol **6**(4): 338-44.
- von Mutius, E. (2007). "Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence." Immunobiology **212**(6): 433-9.
- Wantke, F. and S. Wöhrl (2008). "Penicillinallergie." 10-13.
- WHO (1966). "Organisation W H International drug monitoring."
- Wills-Karp, M. (2001). "IL-12/IL-13 axis in allergic asthma." J Allergy Clin Immunol **107**(1): 9-18.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, et al. (1998). "Interleukin-13: central mediator of allergic asthma." Science **282**(5397): 2258-61.
- Wing, K., Y. Onishi, et al. (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." Science **322**(5899): 271-5.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, et al. (2001). "Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma." Clin Exp Immunol **125**(2): 177-83.
- Yoshihisa, Y. and T. Shimizu "Metal allergy and systemic contact dermatitis: an overview." Dermatol Res Pract **2012**: 749561.
- Zheng, Y. and A. Y. Rudensky (2007). "Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage." Nat Immunol **8**(5): 457-62.
- Ziegler, S. F. (2008). "Regulatory T cells and inflammation: better late than never." Immunity **29**(1): 5-7.

8 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Hertl, Leiter des Instituts für Dermatologie der Universität Marburg bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Pfützner, danke ich besonders für die Themenstellung, die hervorragende Betreuung und seine fachlichen Diskussions- und Verbesserungsvorschläge. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Herzlich danke ich Dr. Christian Möbs, den Betreuer meiner Arbeit, der sich während der gesamten Zeit geduldig meinen Fragen gestellt, mich stets unterstützt hat und immer hilfsbereit war. Damit hat er einen großen Anteil an dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an die ärztlichen und technischen Mitarbeiter der Allergologieabteilung der Hautklinik Marburg, die mich bei der Patientenrekrutierung, den Blutentnahmen und bei der Erhebung von klinischen Parametern für diese Arbeit unterstützt haben. Hier danke ich vor allem Frau Wagenknecht und Frau Weimer für die unkomplizierte, zuverlässige und immer herzliche Zusammenarbeit.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Patienten der Hautklinik bedanken, die sich für diese Studie zu Verfügung gestellt und somit diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter der Dermatologischen Forschungsabteilung des BMFZ für die Hilfestellungen und Beantwortung von Fragen.

Selbstverständlich danke ich meiner Familie und meinem geliebten Ehemann für die tatkräftige Unterstützung, in guten wie auch in schlechten Tagen, für ihre Geduld, motivierenden Worte und ihr Vertrauen in mich. Gerne möchte ich Ihnen meine Arbeit widmen.

9 Ehrenwörtliche Erklärung über die selbstständige Anfertigung der Dissertation

Ich erkläre ehrenwörtlich,
dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg
zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel
„Immunologische Pathomechanismen bei Spätypallergie auf Betalactamantibiotika“
im Institut/ in der Klinik für Dermatologie und Allergologie
unter Leitung von Prof. Dr. Wolfgang Pfützner
mit Unterstützung durch Dr. Christian Möbs ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt
und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als
die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch
um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit
als Dissertation vorgelegt.

Inhaltliche Auszüge der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationsorganen
veröffentlicht:

„Clinical and Translational Allergy 2014. “

Marburg, im September 2015

Unterschrift

10 Schriftenverzeichnis

Publizierte Abstracts und Kongressbeiträge

Wolfgang Pfützner, Carolin Intrup, Christian Möbs

Predominance of IL-5-secreting drug-specific T cells in subgroups of patients with drug-induced delayed-type hypersensitivity reaction.

2014; -Drug Hypersensitivity Meeting (DHM), Bern Switzerland

C. Möbs, D.Brick, C.Schäfer, W. Pfützner

Distinct T cell subtypes are responsible for delayed type drug hypersensitivity reactions.

2015; - European Academy of Allergy and Clinical Immunology (EAACI), Barcelona, Spain

11 Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Professoren, Doktoren und Dozenten

in Marburg:

Aigner, Arnold, Aumuller, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Becker, Behr,
Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Fuchs-
Winkelmann, Gress, Grundmann, Grzeschik, Gudermann, Happel, Hasilik,
Hertl, Hoffken, Hofmann, Hoyer, Kann, Klenk, Klose, Koolman, Krause,
Kretschmer, Krieg, Kroll, Kuhn, Lill, Löffler, Lohoff, Lorenz, Maisch, Maier,
Mandrek, Martin, Meier, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer,
Neumüller, Nimsky, Oertel, Pagenstecher, Plant, Ramaswamy, Rausch, Renz,
Richter, Rise, Rohm, Rothmund, Ruchholtz, Schafer, Schmidt, Seitz, Steiniger,
Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zovko.